

**VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN ZWISCHEN EINEM AUS MENSCHLICHEN
DICKDARM ISOLIERTEN GEWEBSKALLIKREIN UND ANDEREN BEKANNTEN
GEWEBSKALLIKREINEN DES MENSCHEN**

Axel Zimmermann

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. G. Heberer
und der Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie
in der Chirurgischen Klinik der Universität München
Leiter: Prof. Dr. rer. nat. H. Fritz

**VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN ZWISCHEN EINEM AUS MENSCHLICHEN
DICKDARM ISOLIERTEN GEWEBSKALLIKREIN UND ANDEREN BEKANNTEN
GEWEBSKALLIKREINEN DES MENSCHEN**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Axel Zimmermann
aus
München

München 1986

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. R. Geiger
.....
.....

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. Fritz
.....

 Prof. Dr. W. Forth
.....

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:
.....

Dekan: Prof. Dr. W. Spann
.....

Tag der mündlichen Prüfung: 3. Februar 1987
.....

Herrn Professor Dr. H. Fritz gilt mein Dank für seine
Unterstützung und Förderung dieser Arbeit.

Herrn Priv. Doz. Dr. R. Geiger und Herrn Priv. Doz. Dr. H. Kortmann
möchte ich besonders danken für ihre ständige und großzügige Bereitschaft,
Hilfe und anregenden Diskussionen.

Außerdem zu Dank verpflichtet bin ich Herrn Prof. Dr. E. Fink
für radioimmunologische Bestimmungen,
Frau Dr. C. Figarella für die Bereitstellung
von Anti-Human Trypsin Serum,
Frau U. Stuckstedte und Frau E. Kraus
für die technische Unterstützung.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. ZUSAMMENFASSUNG	1
2. EINFÜHRUNG IN DIE KALLIKREIN-KININ-SYSTEME	2
2.1 Geschichtlicher Überblick	2
2.2 Zusammenwirken der Komponenten des Systems	3
2.3 Kallikreine / Kininogenasen	4
2.3.1 Plasmakallikreine	5
2.3.2 Gewebeskallikreine	6
2.4 Kininogene	6
2.5 Kinine	7
2.6 Kininasen	8
2.7 Physiologische und pathophysiologische Aspekte der Kallikrein-Kinin-Systeme	9
2.8 Besondere Aspekte des menschlichen Darmkallikreins	10
3. AUFGABENSTELLUNG	15
4. MATERIAL UND METHODEN	16
4.1 Material	16
4.2 Methoden	17
4.2.1 Bestimmung der Kallikreinaktivität	17
4.2.2 Bestimmungen der enzymatischen Aktivität anderer Proteasen	20
4.2.3 Elektrophoresen	21
4.2.4 Radioimmunoassay	22
4.2.5 Proteinbestimmung	23
4.2.6 Affinitätschromatographie	23
4.2.7 DFP-Inaktivierung	24
4.2.8 Immunologische Untersuchungen	24
5. ERGEBNISSE	26
5.1 Vorversuche zur Isolierung	26

5.2	Isolierung des menschlichen Dickdarmkallikreins	28
5.3	Charakterisierung des menschlichen Dickdarmkallikreins	35
5.3.1	Molekulargewichtsbestimmung	35
5.3.2	Aminosäurezusammensetzung	37
5.3.3	Stabilität des Kallikreins	38
5.3.4	Enzymatische Eigenschaften	39
5.3.5	Immunologische Eigenschaften	42
6.	DISKUSSION DER ERGEBNISSE	46
	Literaturverzeichnis	52

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

AcPheArgOEt	:	N α -Acetyl-L-Phenylalanyl-L-Argininäthylester
ADH	:	Alkoholdehydrogenase (E.C.1.1.1.1.)
Ag	:	Antigen
Ak	:	Antikörper
AMP	:	Adenosinmonophosphat
Bis	:	N, N'-Methylen-bis-acrylamid
BK	:	Bradykinin
BSA	:	Rinderserumalbumin
BzArgNHNP	:	N α -Benzoyl-DL-Arginin-p-nitroanilid
BzArgOEt	:	N α -Benzoyl-DL-Argininäthylester
DFP	:	Diisopropylfluorophosphat
E	:	Extinktion
EDTA	:	Äthylendiamintetraessigsäure
GMP	:	Guanosinmonophosphat
HCK	:	Menschliches Darmkallikrein
HMW	:	high molecular weight
HSK	:	Menschliches Serumkallikrein
HK	:	Menschliches Harnkallikrein
IgG	:	Immunglobulin G
Imp	:	Impuls
KE	:	Kallikrein-Einheit
KFE	:	Kinin-forming-enzymes
KIE	:	Kallikrein-Inhibitor-Einheit
LMW	:	low molecular weight
MG	:	Molekulargewicht
mU	:	milli Enzymeinheit
NAD	:	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
OMTI	:	Ovomucoidtrypsininhibitor
PNTI	:	Trypsininhibitor aus Erdnüssen
RES	:	Reticuloendotheliales System
RIA	:	Radioimmunoassay
SBTI	:	Sojabohnentrypsininhibitor
SDS	:	Natriumdodecylsulfat
SN	:	Supernatant
TosArgOMe	:	N α -Tosyl-L-Argininmethylester
TRA	:	Triäthanolamin-hydrochlorid
Tris	:	Tris (hydroxymethyl) aminomethan

1. ZUSAMMENFASSUNG

Eine im menschlichen Dickdarm vorkommende Kininogenase (Kallikrein) wurde mittels Gelchromatographie an Sephacryl S-200 und Affinitätschromatographie an trägergebundendem Aprotinin isoliert und biochemisch als Kallikrein charakterisiert.

Die Präparation hatte eine spezifische Aktivität von 1,3 U/mg (Substrat: AcPhe-ArgOEt); eine dem menschlichen Harnkallikrein in der Empfindlichkeit vergleichbare Senkung des Hundeblutdrucks wurde nach intravenöser Injektion beobachtet.

Das Molekulargewicht des Enzyms wurde durch Gelchromatographie zu 70.000 bestimmt. Nach Reduktion mit Mercaptoäthanol wurden in der Dodecylsulfat-Elektrophorese zwei Proteinbanden gefunden, die einem Molekulargewicht von 27.000 und 70.000 entsprechen.

Bei der Inhibierung des Gewebskallikreins durch DFP bei pH 7,2 und 25°C wurde eine Geschwindigkeitskonstante von $4 \text{ l} \times \text{mol}^{-1} \text{ min}^{-1}$ erhalten.

Das Enzym wurde ferner immunologisch und enzymatisch charakterisiert. Im RIA wurde eine Bindung erhalten, die parallel der Standardkurve (erstellt mit menschlichem Harnkallikrein) verlief. Die durch das Enzym bewirkte Kininfreisetzung aus menschlichem, hochmolekularem Kininogen (HMW-Kininogen) konnte mit Antikörpern gegen menschliches Harnkallikrein, mit Aprotinin und DFP vollständig gehemmt werden. Eine Hemmung des Enzyms mit Antikörpern gegen menschliches Trypsin und Plasmakallikrein wurde nicht beobachtet.

Die Aminosäurezusammensetzung zeigt mit anderen menschlichen Gewebskallikreinen große Ähnlichkeit.

2. EINFÜHRUNG IN DIE KALLIKREIN-KININ-SYSTEME

2.1. Geschichtlicher Überblick

Die ersten Hinweise auf das Vorkommen einer blutdrucksenkenden Substanz im Harn wurden bereits Anfang dieses Jahrhunderts (1909 und 1920) von Abelous und Bardier [1] und von Pribram und Herrnheiser [90] gegeben; eine genauere Untersuchung dieses Phänomens wurde jedoch nicht durchgeführt. Somit begann die Geschichte der Kallikreine eigentlich erst im Jahre 1925, als Frey [42, 67] im menschlichen Harn eine Substanz entdeckte, die eine vorübergehende blutdrucksenkende Wirkung nach intravenöser Gabe bei betäubten Hunden besaß, und deren Wirksamkeit durch Dialyse erhalten blieb, beim Erhitzen aber verloren ging. Im Verlaufe weiterer systematischer Untersuchungen konnte Frey und vor allem seine Mitarbeiter Kraut und Werle zeigen, daß durch Zugabe von Blut [43] diese hypotensive Wirkung inhibiert und durch Zugabe von Säure wieder erhalten werden konnte. Sie führten diese Effekte auf ein Kreislaufhormon zurück und begannen nach der Hormondrüse im Organismus zu suchen.

Im Pankreas von Mensch, Schwein und Rind wurden große Mengen dieser Frey- oder F-Substanz gefunden [68] und selbige nach dem griechischen Synonym für Pankreas ("Kallikrein") benannt [45].

Im Jahre 1936 konnte Werle zeigen [120, 124], daß es sich bei Kallikrein nicht um ein Kreislaufhormon, sondern um ein Enzym handelte, das durch Inkubation mit Plasma eine Substanz freisetzte, die den isolierten Meerschweinchen- bzw. Hundedarm zu lebhaften Kontraktionen veranlaßte, während Kallikrein allein gar nicht oder nur sehr schwach wirksam war. Diese Substanz erhielt zuerst den Namen "darmkontrahierende Substanz" bzw. "gut-contracting substance" [124], später Kallidin [123]; die Vorstufe wurde entsprechend als Kallidinogen benannt.

Weitere Untersuchungen zeigten, daß die pharmakologischen Wirkungen, die bisher dem Kallikrein direkt zugeschrieben wurden, letztlich durch Kallidin verursacht wurden.

Unabhängig davon wurde 1949 von Rocha e Silva und Mitarbeitern [95] eine dem Kallidin ähnliche Substanz entdeckt, indem sie Trypsin oder Schlangengift auf Plasma einwirken ließen. Diese vasodilatorische, die glatte Muskulatur erregende Substanz wurde Bradykinin und seine Vorstufe Bradykininogen genannt. Kallidinogen und Bradykininogen werden heute als Kininogene bezeichnet.

1962 wurde die letzte Komponente des Kallikrein-Kinin-Systems, die Kininasen (Kinin abbauende Enzyme) von Erdös und Mitarbeitern [23] entdeckt.

2.2. Zusammenwirken der Komponenten des Systems

Das Kallikrein-Kinin-System besteht aus vier Hauptkomponenten:

(I) Kininogenasen oder Kallikreinen, (II) Kininogenen, (III) Kininen und (IV) Kininasen. Das Zusammenwirken der Komponenten ist in Abb. 1 dargestellt. Aus den Kininogenen setzen aktive Kallikreine Kinine frei, die eigentlichen Effektoren des Kallikrein-Kinin-Systems. Kinine werden rasch durch Kininasen inaktiviert.

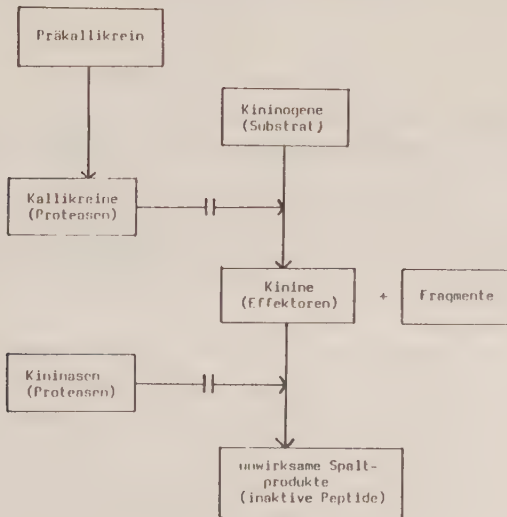


Abb. 1: Das Kallikrein-Kinin-System; —||— > : durch Inhibitoren hemmbar.

2.3 Kallikreine / Kininogenasen

Unter Kininogenasen versteht man alle Enzyme, die aus Kininogenen Kinine (vasoaktive Peptide) freisetzen können. Der Ausdruck Kininogenasen schließt zusätzlich proteolytische Enzyme wie Trypsin, Plasmin, Akrosin etc. mit ein, die in erster Linie ihre natürlichen Substrate spalten, aber auch in der Lage sind, Kinine aus Kininogen freizusetzen [25]. Die Kallikreine sind im Gegensatz dazu Proteasen mit einer hohen Spezifität gegenüber Kininogenen. Durch Spaltung von Peptidbindungen setzen sie aus Kininogenen die pharmakologisch hochaktiven Kinine frei, von denen die wichtigsten das Nonapeptid Bradykinin und das Decapeptid Kallidin sind. Die Kallikreine zählen zu der Gruppe der Serinproteasen und sind Glykoproteine; sie kommen sowohl in Form von inaktiven Vorstufen (Präkallikreinen), als auch in aktiver Form vor (Abb. 1).

Kallikreine können von den Kininogenasen hinsichtlich ihrer blutdrucksenkenden Eigenschaften unterschieden werden. So verursachen Kallikreine einen Blutdruckabfall nach intravenöser Injektion schon in relativ geringer Menge (Gewebskallikrein: 0,008-0,1 µg/kg; Plasmakallikrein: 0,6-1,25 µg/kg), wohingegen vergleichbare Mengen anderer Kininogenasen (z.B. Trypsin) keine Wirkung zeigen.

Im menschlichen als auch im Säugetierorganismus kommen zwei Kallikreinarten vor, die sich hinsichtlich ihres Vorkommens, ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften, ihrer unterschiedlichen Hemmbarkeit, in der Art des bevorzugten Substrates und in der Art der freigesetzten Kinine unterscheiden: das Plasma- oder Serumkallikrein (EC 3.4.21.36) und das Organ-, Drüsen- oder Gewebeskallikrein (EC 3.4.21.35) (Tab. 1).

Merkmal	Plasmakallikreine	Gewebskallikreine
Spaltprodukt	Bradykinin	Kallidin
Molekulargewicht	90 000	25 000 - 40 000
Bevorzugtes Substrat	HMW-Kininogen	LMW-Kininogen
Syntheseort	in Leber	in den entsprechenden Organen
Vorkommen	Blut	Körperflüssigkeiten (Blut, Urin, Samenflüssigkeit), Speicheldrüsen, Pankreas, Niere, Dünn- u. Dickdarm
Inhibitoren	α_1 -Antitrypsin, Antithrombin III, Cl-Esterase-Inhibitor, SBTI, α_2 -Makroglobulin, Trasylol	α_1 -Antitrypsin (progressiv), Trasylol
Funktionen	Faktor des Gerinnungssystems (zusammen mit HMW-Kininogen)	beteiligt an verschiedenen biologischen Prozessen (z.B. Blutdruckregulation)

Tab. 1: Unterscheidungsmerkmale zwischen Gewebs- und Plasmakallikreinen [4, 46, 49]

2.3.1 Plasmakallikrein

Das Plasmakallikrein, ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 90.000 [62] und einem Isoelektrischen Punkt zwischen pH 8 und 9, kommt im Plasma als inaktives Proenzym vor. Als Bildungsort des Plasmakallikreins wird die Leber und das Reticuloendotheliale System (RES) diskutiert [22, 45, 113].

Im Plasma sind spezifische Inhibitoren, wie der Cl-Inaktivator, das α_2 -Makroglobulin, das α_1 -Antitrypsin [49] sowie das Antithrombin III vorhanden, die freierwerdende Plasmakallikreinaktivität potent hemmen können.

Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal zu den Gewebskallikreinen besteht darin, daß das Serumkallikrein Bradykinin bevorzugt aus einem HMW-Kininogen abspaltet [66], wohingegen Gewebskallikreine Kallidin freisetzen.

Plasmakallikrein ist ein Gerinnungsfaktor, der wesentlich an der Festphasenakti-

vierung beteiligt ist. Über die durch Plasmakallikrein induzierte Aktivierung des Faktor XII können weitere Organsysteme aktiviert werden, wie das Blutgerinnungssystem, die Fibrinolyse, die Kininbildung [14, 66, 83] und das Komplementsystem [24, 83].

2.3.2 Gewebskallikreine

Gewebskallikreine kommen im Säugetierorganismus in zahlreichen Geweben und Körperflüssigkeiten vor, wie z.B. in der Bauchspeicheldrüse, Pankreasflüssigkeit, Speicheldrüsen, Speichel, Dünn- und Dickdarm, Niere und Urin [24, 25, 140]; aber auch im Blut [50] und dem Seminalplasma [89].

Man findet sie sowohl in aktiver (Speichel) als auch in inaktiver Form (Pankreassaft) [22, 45, 113]. Im Urin wurden sowohl das Präkallikrein als auch seine aktive Form gefunden [7, 55].

Gewebskallikreine setzen aus LMW-Kininogen Kallidin (Lys-Bradykinin) frei (Tab 1.).

Die verschiedenen menschlichen Gewebskallikreine haben ein Molekulargewicht zwischen 25.000 und 45.000; sie sind immunologisch nicht unterscheidbar. Die Gewebskallikreine werden im Organismus durch α_1 -Antitrypsin progressiv gehemmt, d.h. die Hemmung erfolgt relativ langsam [53].

2.4 Kininogene

Die Kininogene sind Glykoproteine, aus denen Kinine durch die Wirkung von Kallikreinen bzw. Kininogenasen freigesetzt werden. Man unterscheidet zwei Klassen von Kininogenen im Humanplasma: LMW-Kininogen und HMW-Kininogen. Abb. 2 zeigt den schematischen Aufbau der Rinderkininogene.

Die relativ große Ähnlichkeit zwischen dem menschlichen und dem bovinen Kininogen wurde durch neuere Untersuchungen bestätigt [13].

Kininogene kommen im Plasma als auch in menschlichen Körperflüssigkeiten (Samenflüssigkeit, Magensaft und Zervikalschleim) und im Urin vor.

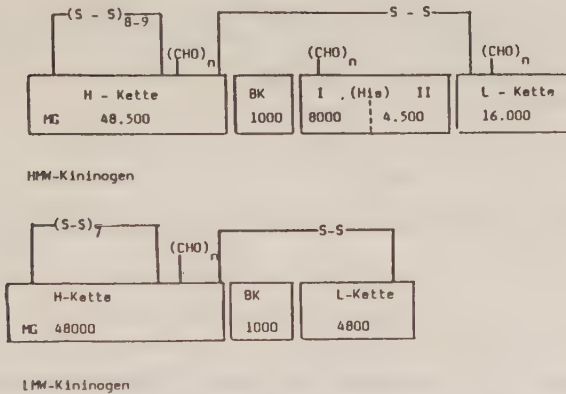


Abb. 2: Schematische Darstellung des HMW- und LMW-Kininogens des Rindes [66].

2.5 Kinine

Kinine sind die eigentlichen Effektoren des Kallikrein-Kinin-Systems. Sie sind pharmakologisch hochaktive Oligopeptide. Folgende Effekte können durch Kinine induziert werden:

- eine periphere Vasodilatation, die eine Durchblutungssteigerung (Hyperämie) und Blutdrucksenkung bewirkt;
- eine Erregung glatter Muskulatur (kontrahierend oder erschlaffend); die meisten glattemuskulären Hohlorgane werden zur Kontraktion erregt (z.B. Uterus, Darm, Bronchien);

- eine Erhöhung der Gefäßpermeabilität (Venolen, Kapillaren), die für die Entzündung von Bedeutung und mit einem verstärkten Stoffaustausch verbunden ist;
- Stimulation der intestinalen Resorption;
- eine Auslösung der Leukozytenmigration;
- Schmerzerzeugung (bei Kontakt mit Oberflächen oder geschädigtem Gewebe);
- eine reflektorische Zunahme der Herzfrequenz, des Schlagvolumens und Herzminutenvolumens;
- eine Stimulierung der Spermienzahl und -motilität bei Oligo- und Asthenozoospermie [84, 89, 106, 107, 108, 111];
- eine Steigerung der Zellproliferation und Gewebsregeneration [109, 110];
- Blutzuckersenkung durch Steigerung der Glucoseaufnahme in die Muskelzelle [7, 8, 74].

Außerdem bewirken die Kinine indirekt eine Erhöhung von cyclischem AMP und GMP, von biogenen Aminen und Prostaglandinen [77, 105, 116].

Die biologischen Wirkungen der Kinine erfolgen über spezifische Rezeptoren [24]. Jedoch scheinen die meisten der biologischen Effekte der Kinine über Prostaglandine vermittelt zu werden [77]. So können sich die vielfältigen Effekte der Kinine von Zelltyp zu Zelltyp unterscheiden und dabei sogar am selben Zelltyp von Spezies zu Spezies. Im Organismus werden die Kinine sehr schnell durch Kininasen inaktiviert.

2.6 Kininasen

Kininasen sind Enzyme, die Kinine abbauen können. Man unterscheidet dabei zwei Enzymtypen: Kininase I (Carboxypeptidase N) ist ein Enzym [20], das Arginin- und Lysinreste C-terminal abspaltet, Kininase II (Angiotensin-converting enzyme) [133] spaltet Dipeptide (PheArg oder HisLeu) C-terminal ab.

Ferner gibt es noch Aminopeptidasen, die N-terminal Kinine abbauen. Kininase I kommt im Plasma vor, Kininase II ist Bestandteil der Lungenendothelzellen; in der Niere kommt das Enzym im proximalen Tubulus vor [22, 24]. Aufgrund der raschen Kininasewirkung ist die Halbwertszeit der Kinine sehr kurz und liegt bei Bradykinin unter einer Minute [61, 102]. Kininase II überführt zusätzlich Angiotensin I in das eigentlich wirksame Angiotensin II, das den Blutdruck steigert und die Aldosteronproduktion zu stimulieren vermag [65]. Kininase II kann somit sowohl eine blutdrucksenkende Substanz (Kinine) inaktivieren, als auch durch Angiotensin II-Bildung eine blutdrucksteigernde Substanz erzeugen.

2.7 Physiologische und Pathophysiologische Aspekte der Kallikrein-Kinin-Systeme

In vivo rufen die Kallikreine dieselben Erscheinungen wie die Kinine hervor. Aufgrund ihres breiten Vorkommens und ihrer bemerkenswerten, hochaktiven, pharmakologischen Potenz werden den Kallikreinen eine wichtige Rolle bei vielen physiologischen Vorgängen zugeschrieben (Kap. 2.5). Ihre biologischen Effekte werden bereits durch äußerst geringe Mengen hervorgerufen.

Aufgrund einiger Symptome der Pankreatitis, wie Schmerz, Kreislaufschock, Pankreasoedem und häufige Gesichtsrötung, glaubte man vor einigen Jahrzehnten, daß auch hier die Kinine am Krankheitszustand beteiligt sind, und setzte Trasylol, ein potenter Kallikreininhibitor, erstmals mit Erfolg ein [45, 113].

Den Gewebekallikreinen wird eine wichtige Rolle bei der Nierenfunktion zugeschrieben, da sie den Elektrolyt-Wasserhaushalt, die renale Hämodynamik und somit die Blutdruckregulation beeinflussen können [57, 126]. Da erfolgreiche Behandlungen essentieller Hypertonieformen durch oral verabreichtes Schweinepankreaskallikrein durchgeführt wurden [87, 88], kann bei einem Teil der Hypertonieerkrankungen mit einer möglichen Störung des Kallikrein-Kinin-Systems

gerechnet werden. In der Niere befindet sich demzufolge das Kallikrein-Kinin-System und das Renin-Angiotensin-System in einem möglichen hämostatischen Gleichgewicht. Das Schlüsselenzym, das das Gleichgewicht zwischen beiden Systemen reguliert, ist Kininase II (angiotensin I converting enzyme) [9, 103].

Aber auch im Plasma-Kallikrein-System gibt es Krankheiten, die mit einem Mangel an verschiedenen Komponenten des Systems einhergehen. So besteht beim erblichen Angioneurotischen Oedem ein Mangel des C-1-Esterase-Inhibitors, dem wichtigsten Kallikrein-Inhibitor im Plasma [100].

Beim rezessiv erblichen Hagemanfaktormangel ist die Aktivierung der Kinine und anderer proteolytischer Enzymsysteme vermindert (Gerinnungszeit verlängert) [91].

Eine andere Gerinnungsstörung, die sog. Fletcher-Krankheit, ist durch das Fehlen von Plasmapräkallikrein charakterisiert. Bei diesem Syndrom besteht eine verlängerte Prothrombinzeit, die durch Gabe von Präkallikrein behandelt werden kann [120, 132].

Auch ein Mangel an Kininogen kommt in der Reihe der erblichen Erkrankungen vor: Fitzgerald, Williams, Flaujeac, Reid und Fujiwara [24, 83]. Allen fünf Krankheiten ist eine Verlängerung der Blutgerinnung *in vitro* und eine Verminderung der Fibrinolyse und Kininbildung gemeinsam. Diese Krankheiten verdeutlichen die wichtige Rolle des Kininogenmoleküls im Blutgerinnungs- und Fibrinolyse-System.

2.8 Besondere Aspekte des menschlichen Darmkallikreins

Den ersten Hinweis auf das Vorliegen eines Darmkallikreins gab Werle 1960, als er über eine durch Trypsin aktivierbare, blutdrucksenkende, hochmolekulare,

thermolabile Substanz im Dick- und Dünndarmhomogenat, bei verschiedenen Säugetierarten, einschließlich Mensch, berichtete. Hierbei stellte er ferner fest, daß im Dickdarm der meisten untersuchten Spezies diese kallikreinartige Substanz wesentlich konzentrierter vorlag, als im Dünndarm [122, 127].

Einige Jahre später (1965) zeigten Amundsen und Nustad, daß kininfreisetzende Aktivität auf der ganzen Länge des Magen-Darm-Traktes bei Ratten und Kaninchen zu finden ist [2]. Auch Burger und Mitarbeiter fanden diese Kininogenaseaktivität in Fraktionen der Dünndarmschleimhaut von Kaninchen [5]. Zeitlin bestätigte 1970 mit seinen Ergebnissen den Befund von Amundsen und Nustad, daß kininbildende Enzyme in der Darmwand von Ratten entlang des ganzen Verdauungstraktes verteilt sind [134], und fand ein Jahr später Hinweise, daß das aus Rattendarm gewonnene Enzym in seinen Eigenschaften den Organkallikreinen ähnlich ist [135]. Dagegen isolierte Seki und Mitarbeiter 1972 aus der Kolonmucosa von Ratten, Hunden, Rhesusaffen und Menschen eine Kininogenase mit einem Hemmverhalten ähnlich den Plasmakallikreinen [104].

1973 entdeckten Zeitlin und Smith, daß von den drei Darmschichten des menschlichen Kolons praktisch nur die Mucosa Kallikrein enthält und in der Submucosa und Muscularis unter normalen physiologischen Bedingungen nur geringe Konzentrationen vorhanden sind [139].

Fasth und Mitarbeiter fanden 1978 bei der Reizung der Nervi pelvini, wie sie auch bei der Defäkation geschieht, am atropinbehandelten Katzenkolon neben einer Vasodilatation und Kolonkontraktion, die durch Bradykinininfusionen nachvollzogen werden können, eine vermehrte Freisetzung von Dickdarmkallikrein [29].

Sowohl Werle und Vogel als auch Seki und Mitarbeiter fanden im menschlichen Kolonhomogenat mehr als 90% inaktives Präkallikrein [104, 127]. Das Darmpräkallikrein wird wahrscheinlich in das Darmlumen in einer inaktiven Form sezerniert, und dann an Ort und Stelle aktiviert [40].

Seki und Mitarbeiter fanden im Humankolon ein kininfreisetzendes Enzym mit einem Molekulargewicht von 71.000. Dies spaltete aus LMW-Kininogen vorwiegend Bradykinin ab und besaß ein Hemmspektrum ähnlich dem des Serumkallikreins.

Die Autoren bezeichneten deshalb das menschliche Dickdarmkallikrein (HCK) als eine Art Plasmakallikrein [104]. Dagegen isolierten Zeitlin und Mitarbeiter ein Kallikrein aus Rattendarm mit einem Molekulargewicht von 33.000 und einem Hemmverhalten ähnlich dem der Organkallikreine [137].

Eine eindeutige Klassifizierung gelang auch Billing in seiner Dissertationsarbeit nicht. Er bestätigte zwar das von Seki bestimmte Molekulargewicht von 70.000, aber auch hier bestanden Unterschiedlichkeiten im Hemmverhalten [4].

Das Darmkallikrein wird möglicherweise in der Darmwand selbst gebildet. Ob es sich um resorbiertes Pankreaskallikrein handelt, ist fraglich, da nach Pankreasexstirpation bei Hunden der Kallikreingehalt des Darmes unverändert bleibt [128]. Die physiologische bzw. pathophysiologische Bedeutung der Darmkallikreine ist noch weitgehend ungeklärt. Über die Kininbildung wirken sie wahrscheinlich auf die Darmmotilität, Durchblutung der Darmwand, Permeabilität der Schleimhaut und somit fördernd auf die Resorption. Schon frühere Untersuchungen auf die Wirkung der Kallikreine am Darm ergaben Unterschiede in der Reaktion verschiedener Säugetierspezies und verschiedener Darmabschnitte.

Die Kallikreine bzw. Kinine lösen aber vorwiegend Kontraktionen des Darmes und eine Erhöhung des Darmtonus aus. Intraarterielle Infusionen von synthetischem Bradykinin in das Katzenkolon bewirken eine Erhöhung des Blutflusses, der Kapillarpermeabilität und Kolonmotilität [28]. Somit könnte das Darmkallikrein an der Regulierung der physiologischen Darmvorgänge beteiligt sein.

Sowohl Meng und Haberland als auch Dennhardt und Haberich beschrieben einen gesteigerten Transport von Glucose durch die Darmschleimhaut von

Ratten durch Kallikreingabe [8, 78]. Diese resorptionsfördernde Wirkung der Kallikreine wurde aber auch noch für andere Stoffe gefunden, so für bestimmte Elektrolyte, wie Natrium-, Kalium- [8] und Kalziumionen [17], Aminosäuren [80, 81, 82] und Vitamin B₁₂ bei Patienten mit 2/3-Magenresektion [101].

Der Gehalt an Dickdarmkallikrein bei Säugetieren und Menschen ist unterschiedlich, wobei beim Menschen die höchsten Werte gefunden wurden [104, 127]. Auch die Kallikreinkonzentrationen in den einzelnen Darmabschnitten sind verschieden. So findet man in der Magenwand die geringste, im Caecum bei weitem die höchste Aktivität [39, 41].

Abhängig ist die gefundene Kallikreinmenge des Darmes auch von der Art der Nahrung [132]. Auch Frankish und Zeitlin konnten zeigen, daß der Gehalt an kininbildenden Enzymen (KFE) vom Füllungszustand und der Ernährungsart abhängig sind [41]. Aber auch Kallikrein selbst wird durch die Darmschleimhaut resorbiert. So konnte Fink und Mitarbeiter beweisen, daß exogen zugeführtes Organkallikrein durch die Rattendarmschleimhaut in kleinen Mengen resorbiert werden kann [36].

Die pathophysiologische Bedeutung der Darmkallikreine ist noch weitgehend ungeklärt. Für einige entzündliche Erkrankungen des Darms scheint die Tatsache, daß die Kininogenasen pathobiochemisch zu den Mediatoren der akuten Entzündungen zählen, wichtig zu sein. In diesem Zusammenhang ist wahrscheinlich die Colitis ulcerosa zu sehen, bei der relativ hohe Konzentrationen an aktiven Kallikrein in der Muscularis propria gefunden wurden, dagegen der Kallikreingehalt der Mucosa und der Kininogengehalt in der Muscularis kaum verändert war [139]. Die Wirkung der Kinine auf die Kolonmuskulatur ist unterschiedlich. Während die Ringmuskulatur erschlafft, kommt es zu einer Kontraktion der Tänien (Längsmuskulatur) [18, 37]. So könnte die Kürzung des Dickdarms mit Aufhebung der Haustrierung und auftretenden Motilitätsstörungen - typisch für diese Krankheit - erklärt werden.

Beim Dumping-Syndrom entleert sich der resezierte Magenrest schnell und

verursacht eine hyperosmolare Lösung im Dünndarm. Zeitlin und Smith wiesen 1966 die Freisetzung von vasoaktiven Kininen bei Dumpingattacken nach [138]. Auch stellte man fest, daß hyperosmolare intestinale Glucosekonzentrationen die Freisetzung von kininbildenden Enzymen zur Folge haben [131]. Diese Befunde machen eine Beteiligung des Kallikrein-Kinin-Systems am Dumping-Syndrom wahrscheinlich. Beim experimentellen Ileus am Hund erhöht sich die Kallikreinkonzentration des proximalen Darmabschnittes, wobei das Enzym vorwiegend in aktiver Form vorliegt, die des distalen erniedrigt sich [128]. Ob diese Feststellung bei pathologischen Darmverschlüssen eine Bedeutung hat, ist noch nicht bekannt.

Eine Aktivierung des Kallikreins aus seiner Vorstufe beobachtet man auch beim Adenocarcinom des menschlichen Kolons. Zwar ist die Kallikreinkonzentration nicht erhöht, aber es enthält aktives Kallikrein anstatt des normalerweise in der Darmwand vorkommenden Präkallikreins.

3. AUFGABENSTELLUNG

Thema dieser Dissertationsarbeit war es, die begonnenen Untersuchungen von Billing [4] fortzuführen, d.h. eine Verbesserung der Reinigungsmethode für eine Dickdarm-Kininogenase zu erarbeiten. Es sollte dabei ein relativ einfaches Isolierungsverfahren mit hoher Ausbeute gefunden werden, das ein Enzym mit möglichst hoher Reinheit lieferte. Das Enzym sollte biochemisch charakterisiert und klar als Plasma- oder Gewebeskallikrein identifiziert werden. Dazu sollte es mit Plasmakallikrein und anderen Gewebeskallikreinen verglichen werden, insbesondere mit menschlichem Harnkallikrein. Eine eindeutige Zugehörigkeit sollte erreicht werden, da in früheren Arbeiten [45, 104, 127, 136, 137] eine eindeutige Zuordnung nicht möglich war.

Zu diesem Zweck sollte das gereinigte Enzym physiko-chemisch (Elektrophorese, Aminosäurezusammensetzung, Molekulargewicht etc.) untersucht werden.

Ferner sollten Hemmstudien mit verschiedenen Inhibitoren durchgeführt werden. Untersuchungen der biologischen Aktivität (Hundeblutdrucktest, Rattenuterustest) sowie immunologische Studien sollten zur weiteren Identifizierung beitragen.

4. MATERIAL UND METHODEN

4.1 Material

CNBr-aktivierte Sepharose, Sephacryl S-200, Sephacryl G-25 und Phenyl-Sepharose CL-4B wurden von Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden, bezogen. Aprotinin-Sepharose wurde nach Geiger et al [52] hergestellt.

Menschliche Kolonpräparate

Gesundes, menschliches Kolon wurde während Kolotomie chirurgisch entfernt und unmittelbar in flüssigen Stickstoff (-196°C) schockgefroren. Das Gewebe wurde bis zur weiteren Aufarbeitung bei -70°C gelagert.

Proteine und Enzyme

Cytochrom C (Pferdeherz, reinst, salzfrei), Gammaglobulin (Rinderserum, Iyo, rein) und Hämoglobin (Rind, Iyo, rein) wurden von der Firma Serva, Heidelberg, BRD, Serum-Albumin (Rind, reinst) von den Behringwerken, Marburg, Phosphorylase b (Kaninchenmuskel, lyophilisiert), Carboanhydrase (Rindererythrozyten, lyophilisiert), Trypsin (Rind, krist., Iyo), ADH (aus Hefe, Suspension) von der Firma Boehringer, Mannheim und Schweinepankreasallikrein (1030 KE/mg) von Bayer AG, Leverkusen, bezogen. Menschliches Harnkallikrein (1000 U/mg; Substrat AcPheArgOEt) und menschliches Plasmakallikrein (17,3 TosArg-OMe-U/A₂₈₀) wurden nach Geiger et al. [55, 62] isoliert.

Inhibitoren

SBTI war ein Produkt der Firma Serva, Heidelberg, Aprotinin (Trasylol Amp: 100.000 KIE/5ml) wurde von der Firma Bayer AG, Leverkusen, DFP von der Firma Sigma, Taufkirchen, BRD, bezogen.

Substrate

BzArgOEt und BzArgNHNP wurden von der Firma Merck, Darmstadt, SucPheNHNP und NAD (Grad II) von der Firma Boehringer, Mannheim, Bradykinin

von der Firma Sandoz, Basel, und Met-Lys-Bradykinin von der Protein Research Foundation, Osaka, Japan, bezogen. HMW-Kininogen wurde nach Mann und Geiger [74] isoliert; AcPheArgOEt nach Fiedler et al [32] synthetisiert.

4.2. Methoden

4.2.1 Bestimmung der Kallikreinaktivität

Um die Aktivität von Kallikreinen zu bestimmen, können sowohl biologische als auch esterolytische Eigenschaften des Enzyms verwendet werden. Die Definition der Einheiten wird bei den entsprechenden Tests erläutert.

Hundeblutdrucktest

Die Bestimmung der Kallikreine wird am narkotisierten Hund durchgeführt. Nach i.v. Injektion der Probe- bzw. Standardlösung in die V. femoralis wird der mittlere Carotidruck fortlaufend registriert. Dabei ist eine biologische Kallikrein Einheit (KE), diejenige Kallikreinmenge, die bei i.v.-Injektion an der Carotidruckkurve des Hundes dieselbe Senkung hervorruft wie 5ml Menschenharn, die einer Sammelprobe von 50 l entnommen wurden (24 Stunden gegen fließendes Wasser dialysiert).

Kininfreisetzung (Ratten-Uterus-Test)

Hier wird die Kallikrein-induzierte Kininfreisetzung aus Kininogen mit Hilfe eines biologischen Testverfahrens am isolierten Rattenuterus bestimmt. Die durch die Kinine bedingten Uteruskontraktionen wurden über einen Schreiber aufgezeichnet und größenmäßig bestimmt. Die Stärke der Kontraktionen (ein Maß für den Kiningehalt) wurde mit Hilfe von Bradykininstandardlösungen

verglichen. Dazu wurden aliquote Proben in ein mit Jalon'scher Lösung beschicktes Gewebepad, das ein zur Meßung vorbereitetes Uterusstück enthielt, injiziert.

Eine Kinineinheit ist diejenige Menge, die der Wirksamkeit von 1 Mikrogramm synthetischen Bradykinin am isolierten Rattenuterustest entspricht.

Synthetische Substrate: BzArgOEt und AcPheArgOEt

Die Enzymaktivität der Kallikreine wurde mit den synthetischen Substraten BzArgOEt und AcPheArgOEt bestimmt.

Substrat Benzoyl-L-Argininäthylester [114]

Das Prinzip des Tests ist die Bestimmung des bei der Spaltung von BzArgOEt freiwerdenden Äthylalkohols mit Hilfe der Alkoholdehydrogenase.

Testansatz:

- | | |
|---------------|--|
| (2,38 - x) ml | Pyrophosphat-Puffer: (15,2 g tetra-Natriumphosphat, 4,1 g Semicarbazid und 0,9 g Glycin in aqua dest. lösen, mit 2 N NaOH auf pH 8,7 einstellen und mit aqua dest. auf 500 ml auffüllen) |
| 0,1 ml | NAD (20 mg NAD in 1 ml aqua dest.) |
| 0,02 ml | ADH (100 mg/3,4 ml) |
| 0,5 ml | BzArgOEt (100 mg BzArgOEt in 10 ml aqua dest.) |
| | 5 Minuten bei 25°C |
| x ml | Kallikreinlösung ($0 < x \leq 0,2$) |

Nach Zugabe der Kallikreinlösung wird die Veränderung der Extinktion bei 366 nm photometrisch verfolgt, wobei $0,0011 \Delta E/\text{min}$ 1 mU entsprechen.

Substrat Acetyl-Phenylalanin-Argininäthylester [32]

Das Prinzip dieses enzymatischen Tests ist dem BzArgOEt-Test vergleichbar. Ebenfalls wird freigesetzter Äthylalkohol mittels ADH bestimmt.

Testansatz:

2 ml	Pyrophosphatpuffer (0,15 mol/l Natriumdiphosphat, 0,15 mol/l Semicarbazid und 0,0375 mol/l Glycin, mit NaOH auf pH 8,7 einstellen)
0,1 ml	NAD (0,03 mol/l)
0,1 ml	AcPheArgOEt + HAc (0,015 mol/l)
0,02 ml	ADH (100 mg / 3,4 ml)
(0,28 + x) ml	aqua dest.
	5 Minuten bei 25°C
(0,5 - x) ml	Kallikreinlösung ($0 \leq x \leq 0,5$)

Eine Extinktionsänderung von $0,0011 \Delta E/\text{min}$ entspricht 1 mU.

4.2.2 Bestimmungen der enzymatischen Aktivität anderer Proteasen

Trypsin: Messung mit BzArgNHNP als Substrat [49]

Die Freisetzung von p-Nitroanilin aus N-Benzoyl-arginin-p-nitroanilid wird anhand der Extinktionszunahme bei 405 nm direkt verfolgt. Bestimmung von $\Delta E/\text{min}$.

Testansatz:

(1,8 + x) ml	TRA-Puffer (0,2 mol/l Triäthanolaminhydrochlorid) 0,02 mol/l Calciumchlorid, pH 7,8)
(0,2 - x) ml	Trypsinlösung (ca. 50 mU/ml)
1 ml	BzArgNHNP-Lsg. (100 mg in 100 ml aqua dest. (2,2 mmol/l)).

Eine Extinktionsänderung von 0,00332 $\Delta E/\text{min}$. entspricht dabei 1 mU.

Chymotrypsin: Messung mit SucPheNHNP als Substrat [49]

Prinzip: Messung des abgespalteten p-Nitroanilins bei 405 nm. Bestimmung von $\Delta E/\text{min}$.

Testansatz:

(1,8 + x) ml	TRA-Puffer (0,2 mol/l Triäthanolamin + HCl, 0,1 mol/l CaCl_2 , pH 7,8)
(0,2 - x) ml	Chymotrypsinlsg. (ca. 5 mU/ml)
1 ml	SucPheNHNP-Lsg. (50 mg in 10 ml Puffer - 12,9 mmol/l)

4.2.3 Elektrophorese

ACRYLAMIDGEL-ELEKTROPHORESE

Es wurde das Gel-System Nr. 6 (pH 7,3 und 8,9, 7,5% Gel) nach Maurer [76] verwendet.

Elektrophoresebedingungen

1. Lauf: pH 7,3, 7,5% Gel: 140 Minuten bei 300 V, 45 mA

2. Lauf: pH 8,9, 7,5% Gel: 120 Minuten bei 150 V, 95 mA

Die Gele wurden mit Coomassie Blue G-250 (Serva, Heidelberg) gefärbt und mit einer Lösung von Eisessig, Methanol und Wasser im Verhältnis 1:6:14 entfärbt.

ACRYLAMIDGEL-ELEKTROPHORESE MIT NATRIUMDODECYLSULFAT (SDS)

Eine Methode der Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen ist die Elektrophorese mit SDS nach Dunkert und Rueckert [15].

Die Proteinlösungen wurden mit Harnstoff, SDS und Mercaptoäthanol 1 Stunde bei 45°C inkubiert. Das Molekulargewicht wurde mit Hilfe von MG-Standardsubstanzen von Bio-Rad (Richmond, California) bestimmt.

Die Proteine wurden bei 90 V und 140 mA getrennt. Färben und Entfärben wurden, wie unter Acrylamidgelelektrophorese beschrieben, durchgeführt.

4.2.4 Radioimmunoassay (RIA) für menschliches Harnkallikrein

P U F F E R:

Puffer A: 0,4 mol/l KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , pH 7,5

Puffer B: 0,05 mol/l KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , 0,15 mol/l NaCl, 200 mg/l Merthiolat, pH 7,5

Puffer C: 0,05 mol/l KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , 0,15 mol/l NaCl, 2 g/l Rinderserumalbumin, 200 mg/l Merthiolat, pH 7,5

Puffer D: 0,01 mol/l KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , 0,15 mol/l NaCl, 100 g/l Rinderserumalbumin, 200 mg/l Merthiolat, pH 7,5

Puffer E: 0,01 mol/l KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , 0,1 mol/l NaCl, 10 g/l Rinderserumalbumin, 200 mg/l Merthiolat, pH 7,5

Die Jodierung von Kallikrein wurde nach einer Modifikation der Chloramin-T-Methode [58], beschrieben von Erhardt und Mitarbeiter [26] durchgeführt. Zu 2,5 µg Kallikrein in Puffer B und 40 µl Na^{125}I -Lsg. (0,4 mCi) in Puffer A wurden 10 µl (30 µg) Chloramin-T-Lsg. gegeben. Nach 20 Sekunden wurde die Jodierungsreaktion durch Zugabe von 20 µl (60 µg) Natriummetabisulfit und 200 µl Puffer C gestoppt. Der Reaktionsansatz wurde dann sofort mittels Gelfiltration aufgetrennt. Die Fraktion mit der höchsten Radioaktivität wurde nochmals über eine Biogel P-60-Säule (äquilibriert mit Puffer D, ausgewaschen mit Puffer E) gelfiltrierte. Die Fraktionen des radioaktiven Peaks wurden vereinigt, mit Puffer E auf eine Radioaktivität von 200.000 Imp/min·ml verdünnt und bei -40°C eingefroren.

Lösungen des Kallikrein-Standards und die zu untersuchenden Proben und Antiseren wurden mit Puffer E verdünnt. Zu Kaninchenserum (3,5 ml/l) wurden ^{125}I -Kallikrein-Lsg. zugefügt. 0,1 ml Antiserum wurden in einem Verhältnis von 1:32.000 verdünnt und in Reaktionsgefäße pipettiert. Das Reaktionsgemisch wurde bei 22°C für 24 Stunden inkubiert. Danach wurden 0,1 ml des zweiten Antiserums (gegen Kaninchen IgG produziert in Ziegen) in einer Verdünnung

von 1:30 zugegeben. Nach Inkubation bei 4°C für 4-8 Stunden wurde zentrifugiert (2000 g, 30 Minuten), der Überstand abgesaugt und die Radioaktivität der Präzipitate bestimmt. Die Erstellung der Standardkurven und Berechnung der unbekannten Kallikreinkonzentrationen erfolgte mit Hilfe eines Computerprogramms nach der Spline-Approximationsmethode [75] bzw. Logit-log-Transformation [94].

4.2.5 Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde nach der Methode von Folin-Ciocalteu durchgeführt [38, 71]. Als Bezugsstandard wurde Schweinepankreas-kallikrein benutzt.

4.2.6 Affinitätschromatographie

Affinitätschromatographie an trägergebundenem Trasylol [141]

10 g CNBr-aktivierte Sepharose 4 B wurden mit 1 mmol/l HCl auf einem Sinterglasfilter (G 3) gequollen und gewaschen. 200 mg Trasylol wurden in 5 ml Natriumhydrogencarbonat-Puffer (0,1 mol/l NaHCO_3 , 0,5 mol/l NaCl, pH 8,3) gelöst. Die Gelsuspension und die Trasylollösung wurden vereinigt und 2 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Danach wurde ungebundenes Material mit Natriumhydrogencarbonatpuffer ausgewaschen und die Suspension 2 Stunden mit 1 mol/l Äthanolamin-Lösung (pH 9,0) geschüttelt. Anschließend wurde in 5 Waschzyklen nicht kovalent gebundenes Protein entfernt, wobei jeder Waschzyklus aus einem Waschvorgang mit pH 4,0 (0,1 mol/l Natriumacetat, 1 mol/l NaCl) und pH 8,0 (0,1 mol/l NaHCO_3 + 1 mol/l NaCl) bestand. Anschließend wurde die Trasylol-Sepharose 3mal mit Trasylolsäulenpuffer (0,025 mol/l Na_2HPO_4 , 0,025 mol/l KH_2PO_4 , 0,75 mol/l NaCl, pH 7,0) gewaschen und bei 4°C aufbewahrt.

4.2.7 DFP-Inaktivierung [33]

Die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstante für die Humankolonkallikrein-Hemmung durch DFP wurde nach Fiedler [33] durchgeführt.

Das menschliche Dickdarmkallikrein wurde mit Puffer (0,2 mol/l Natrium Phosphat-Puffer, 1 mmol/l EDTA, pH 7,2) auf 500 µl (AcPheArgOEt-Aktivität: 36 mU/ml) verdünnt. Davon wurden 100 µl für Aktivitätsmessung ohne DFP verwendet. Zu den restlichen 400 µl des Gemisches wurden 10 µl DFP-Lösung (5 µl konz. DFP-Lsg. und 495 µl Isopropylalkohol) zugegeben und bei 25°C inkubiert. Nach 10, 20, 30 und 60 Minuten wurde die esterolytische Aktivität im AcPheArgOEt/ADH-Test bestimmt. Die bimolekulare Geschwindigkeitskonstante K errechnet sich aus der Formel $K = K' / [DFP]$, wobei $K' [E] = - d[E] / dt = v$ ist ($[E]$ = Konzentration der enzymatischen Kallikreinaktivität).

4.2.8 Immunologische Untersuchungen

Immunologische Untersuchungen nach Ouchterlony

Als Verfahren wurde die radiale Immundiffusion in Agargel nach Ouchterlony [86] gewählt. Glasplatten wurden mit 1% (w/v) Agarose in 0,1 mol/l Natriumbarbital/HCl, pH 8,0 beschichtet und rosettenartig angeordnete Löcher in das Gel gestanzt. In die zentrale Ausstanzung wurde das Kallikrein (Antigen) gegeben. In die radial dazu angeordneten Stanzlöcher wurden die Antikörperlösungen in verschiedenen Konzentrationen einpipettiert.

Hemmung der Kininfreisetzung mit Antikörpern

5 µl HCK-Lösung (8 µg), 5 µl Gammaglobulinlösung und 40 µl physiologischer Natriumchloridlösung wurden für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wurden zum Inkubationsgemisch 200 µl 0,15 mol/l Tris/HCl-Puffer (pH 8,6), der 4 mmol/l EDTA, 10 mmol/l 8-Hydroxychinolin und 1 mg HMW-Kininogen enthielt, zugegeben und für 10, 20, 30 und 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 0,005 ml Trasylol und Erhitzen auf 100°C für 10 Minuten wurde die Reaktion gestoppt. Die ungehemmte Kallikreinaktivität wurde durch das Hinzufügen von 5 µl 0,9% NaCl-Lösung anstelle von Gammaglobulin bestimmt. Die Leerprobe (spontane Kininfreisetzung) enthielt 10 µl 0,9% NaCl-Lösung anstelle von HCK und Gammaglobulin.

5. ERGEBNISSE

5.1 Vorversuche zur Isolierung

Um das von Billing erarbeitete Isolierungsverfahren [4] zu verbessern (vgl. Aufgabenstellung, wurden verschiedene Vorversuche durchgeführt, die dazu dienen sollten, das Enzym während der Anfangsphase der Isolierung zu stabilisieren und ferner die Ausbeute bei der Extraktion aus dem Gewebe zu verbessern.

Dazu wurden im einzelnen 0,1% (w/v) Triton-X-100 dem Extraktionspuffer zugesetzt. Leider zeigte sich dadurch keine Verbesserung der Stabilität während der Isolierung. Innerhalb von 10 Tagen bei 4°C fiel die BzArgOEt-spaltende Aktivität der Präparation auf ca. 30% ab (Abb. 3). Außerdem schäumten die Suspensionen durch den Zusatz von Triton-X-100 relativ stark. Deshalb wurde später auf die Beigabe von Triton-X-100 wieder verzichtet.

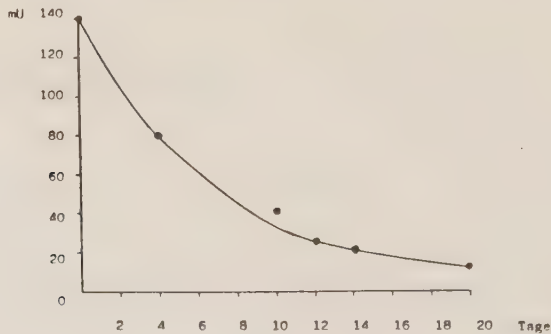


Abb 3: Zeitliche Abnahme der BzArgOEt-spaltenden Aktivität einer Präparation bei 4°C

In weiteren Vorversuchen wurde die Fraktionierung der Proteine mittels Ammoniumsulfat durchgeführt. Nach mehrmaligem Homogenisieren des Darmgewebes

mit 1 mol/l NaCl wurde der Überstand zu 60% mit Ammoniumsulfat gesättigt, 30 Minuten bei 4°C gerührt und 12 Stunden stehen gelassen. Der Niederschlag wurde mittels Ultrazentrifugation (40.000 g, 4°C, 30 Minuten) abgetrennt, das Zentrifugat in 10% des ursprünglichen Volumens gelöst und über Papierfilter filtriert. Ähnlich wie bei Billing wurde eine Aktivitätsausbeute von 40% erreicht.

Zwar brachte diese Methode eine relativ gute Reinigung, aber trotz des Ultrazentrifugationsschritts wurde keine befriedigende Trennung von Präzipitat und Überstand erreicht. Vor allem aufgrund der niedrigen Ausbeute wurde diese Methode wieder verlassen.

Billing [4] homogenisierte und zentrifugierte das Gewebe mehrmals hintereinander in Salzlösungen mit relativ geringer Ionenstärke, bevor mit höherer Ionenstärke weitergearbeitet wurde. Wegen des relativ raschen Aktivitätsabfalles in der ersten Phase der Isolierung wurde auf dieses mehrmalige Homogenisieren verzichtet und bereits beim ersten Homogenisieren dem Puffer 1 mol/l NaCl zugegeben. Es zeigte sich im Vergleich zum mehrmaligen Homogenisieren zwar ein höherer Proteingehalt und damit eine niedrigere spezifische Aktivität, aber die enzymatische Aktivität war um ca. 80% größer (Tab. 2)

Schritt	Enzymatische Aktivität (mU/ml)	Proteingehalt	Spezifische Aktivität (mU/mg)
Mehrmaliges Homogenisieren einschließlich mit 1 mol/l NaCl	127	0,7	181
Einmaliges Homogenisieren mit 1 mol/l NaCl	227	1,8	126

Tab. 2: Vergleich der Aktivitätsausbeuten verschiedener Homogenisierungsverfahren

Um eine höhere Aktivität des Überstandes zu erreichen, wurde dem Homogenisierungspuffer statt 1 mol/l NaCl-Lsg., eine 2 mol/l NaCl-Lsg. zugegeben. Dabei zeigte sich, daß nach Homogenisieren mit 2 mol/l NaCl und Zentrifugieren eine viel geringere BzArgOEt-Aktivität gemessen wurde als mit 1 mol/l NaCl.

Auch eine weitere Reinigung und Anreicherung durch Dialyse und Lyophilisieren konnte nicht praktiziert werden, da sich die beim Gefriertrocknen erhaltene Substanz nicht wieder auflösen ließ. Ähnliche Probleme ergaben sich auch für das Schweinepankreas-kallikrein [16].

5.2 Isolierung des menschlichen Dickdarmkallikreins

Nach den Vorversuchen hat sich die nachfolgend beschriebene Methode zur Isolierung von menschlichem Dickdarmkallikrein bestens bewährt.

1. Schritt:

Die tiefgefrorenen Kolonpräparate wurden aufgetaut und mit eisgekühlter physiologischer Kochsalzlösung (4°C) dreimal gespült. Die Tunica mucosa wurde von der Tunica muscularis und serosa mit Skalpell abpräpariert und gesammelt. Die Mucosa wurde mit einer Schere zerkleinert und in 0,05 mol/l Tris-Puffer, pH 7,8, der 0,005 mol/l Calciumchlorid, 0,02% (w/v) Natriumazid und 1 mol/l NaCl enthielt, bei 4°C bis zur anschließenden Weiterverarbeitung aufbewahrt.

Die Mucosa wurde im Potter Elvehjem Homogenisator mit dem zehnfachen Volumen des Gewichts der Mucosa in Tris/HCl-Puffer (715 ml) bei 4°C homogenisiert. Das Homogenat wurde zur Erhöhung der Ausbeute bei 4°C 40 Stunden langsam gerührt.

2. Schritt:

Nach der Extraktion wurde die Suspension mit 40.000 x g 30 Minuten bei 4°C ultrazentrifugiert und der Überstand nach Filtrieren über Papierfilter auf verschiedenste Aktivität hin untersucht (Tab. 3). Das Sediment wurde verworfen.

Der Überstand (715 ml Volumen) enthielt eine Proteinkonzentration von 2,7 mg/ml.

Substrat	Enzymat. Aktivität (mU/ml)	Spez. Aktivität (mU/mg)	Gesamtaktivität (U)
BzArgOEt	237	88	169,5
AcPheArgOEt	104	39	74,4
BzArgNHNP	19	7	13,6
SucPheNHNP	1	0,4	0,7

Tab. 3: Spaltung synthetischer Substrate durch den Colon-Extrakt

Der bei der Ultrazentrifugation erhaltene Überstand (715 ml) wurde mittels Ultrafiltration (Amicon-Membran UM 10) bei 4°C auf ein Endvolumen von 53 ml konzentriert. Auftretende Trübungen wurden durch Ultrazentrifugation bei 4°C (40.000 x g, 30 Minuten) entfernt.

	Spez. Aktivität (BzArgOEt) (mU/mg)	Spez. Aktivität (AcPheArgOEt) (mU/mg)	Verlust in % (BzArgOEt)	Verlust in % (AcPheArgOEt)
Vor Ultrafiltration	88	39		
Nach Ultrafiltration	63	28	28,5	28

Tab 4: Aktivitätsverluste durch Ultrafiltration (Werte aus zwei Isolierungen)

3. Schritt:

Als nächster Reinigungsschritt folgte eine Auftrennung des Ultrafiltrationskonzentrats mittels Gelchromatographie. Eine Sephacryl S-200 Säule (140 x 5 cm) wurde mit 0,1 mol/l Ammoniumformiatpuffer, pH 7,8, bei 4°C äquilibriert. 25 ml (800 mg Protein) Ultrafiltrationskonzentrat wurde bei einer Flußrate von 40 ml/h aufgetragen und mit Ammoniumformiatpuffer (0,1 mol/l, pH 7,8) bei 4°C eluiert (Fraktionsgröße 8 ml) (Abb. 4).

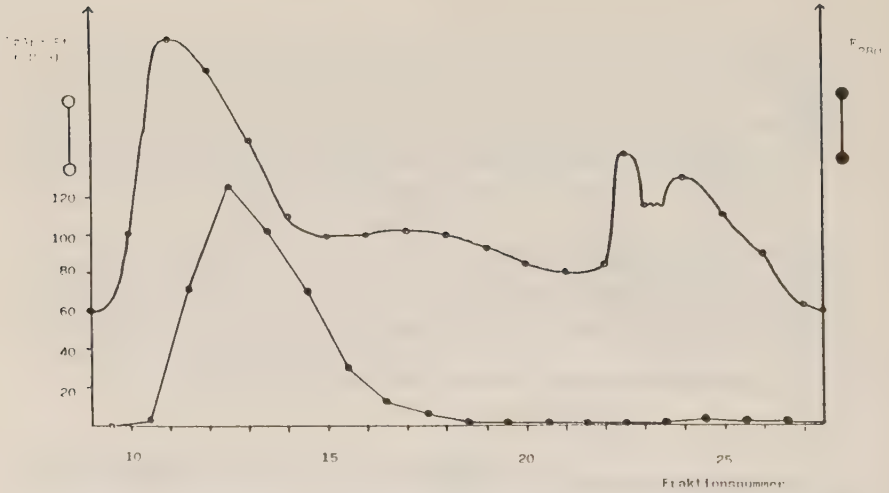


Abb 4: Auftrennung des Ultrafiltrationskonzentrats an Sephacryl S-200:
 ○—○: BzArgOEt-spaltende Aktivität, ●—●: Extinktion bei 280 nm

Ausbeute bei der Gelchromatographie

Bei der Isolierung von menschlichem Darmkallikrein aus zwei verschiedenen Darmpräparaten wurden die Trennungen über Sephacryl S-200 quantitativ untersucht. Es wurden nur die Fraktionen gesammelt, deren Aktivität mehr als 10 mU/ml betrug (Fraktion 12-17). Die prozentuale Ausbeute von ca. 72% zeigt die Tabelle 5.

Sephacryl S-200	BzArgOEt-Aktivität vor Auftrennung(U)	BzArgOEt-Aktivität in Peak A(U)	proz. Ausbeute (%)
Durchschnitt aus zwei Isolierungen	92,2	66,2	71,8

Tab. 5: Ausbeute an menschlichem Darmkallikrein nach Gelfiltration an Sephacryl S-200

Es waren zwei Läufe notwendig, um das nach Ultrafiltration erhaltene Konzentrat (53 ml) an der Sephacryl-Säule aufzutrennen. Alle Fraktionen, deren BzArgOEt-Aktivität höher als 10 mU/ml war, wurden gesammelt und die Kallikrein enthaltenen Fraktionen aus beiden Läufen vereinigt. Es resultierte dabei ein Gesamtvolumen von 782 ml. Das gesammelte Eluat enthielt ca. 1,6 mg/ml Protein, die durchschnittliche BzArgOEt-Aktivität betrug 84,4 mU/ml, die von AcPheArgOEt 59 mU/ml. Es errechnet sich daraus für BzArgOEt eine spezifische Aktivität von 53,6 mU/mg, für AcPheArgOEt eine von 37,5 mU/mg. Das relativ hohe Volumen (782 ml) wurde wieder mit Ultrafiltration (Amicon UM 10) auf ca. 33 ml eingengt.

4. Schritt:

Eine Trasytol-Sepharose-Säule (15 x 1,5 cm) wurde mit Trasytolsäulenpuffer äquilibriert. Danach wurde das ultrafiltrierte Konzentrat auf die Säule aufgetragen und mit Puffer bei Raumtemperatur gewaschen. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug 9 ml/h, die Fraktionsgröße 3 ml. Die Waschlösung erhielt noch erhebliche Mengen an esterspaltender Aktivität.

Es zeigte sich, daß durchschnittlich nur ca. 17% der BzArgOEt-spaltenden Aktivität an die Trasytol-Säule gebunden wurden.

Nach Waschen der Säule wurde das gebundene Protein mit 0,1 mol/l Essigsäure (pH 3,5) mit einer Durchflußgeschwindigkeit von 9 ml/h bei Raumtemperatur eluiert. Die Fraktionssammelgefäße, die jeweils 1,8 ml Eluat aufnahmen, enthielten 0,3 ml 1 mol/l Phosphatpuffer (pH 8,0), um den pH des sauren Eluats sofort auf 7,0 umzustellen (Abb. 5).

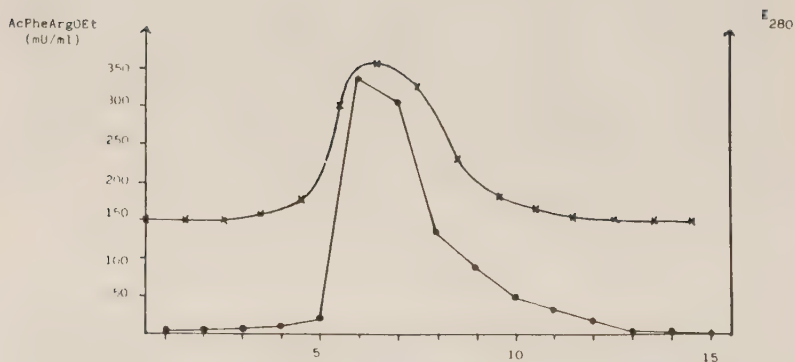


Abb. 5: Affinitätschromatographie an Trasyol-Sepharose; x—x : Protein bei E₂₈₀; •—•: AcPheArgOEt-spaltende Aktivität

Die Fraktionen, die eine AcPheArgOEt-spaltende Aktivität über 10 mU/ml besaßen, wurden vereinigt (49 ml), 24 Stunden bei 4°C gegen 0,05 mol/l Tris/HCl-Puffer, pH 7,4 dialysiert und durch Ultrafiltration auf ein Volumen von 16 ml konzentriert. Die esterolytische Gesamtaktivität wurde vor und nach der Ablösung durch Essigsäure bei der Isolierung von zwei verschiedenen Darmpräparaten bestimmt.

Von der ausgänglichen BzArgOEt-Aktivität (ca. 51 U) wird also nur 1,2% gewonnen. Bezogen auf die AcPheArgOEt-spaltende Aktivität sind es jedoch 4,6% Ausbeute.

Das Konzentrat (16 ml) enthielt 0,1 mg Protein/ml. Für das Substrat BzArgOEt errechnete sich eine spezifische Aktivität von 149 mU/mg, für AcPheArgOEt eine von 1,251 U/mg (s. Anreicherungsübersicht).

Im HMW-Kininogen-Rattenuterustest (Kap. 4.2.1) setzen 5 µl Humankolonkallikreinlösung (8 µg) ungefähr 6 ng Bradykinin frei. Das Konzentrat enthielt das elektrophoretisch reine Humankolonkallikrein (HCK) (Abb. 6).

Schritte	Bedingungen
Abpräparation der Mucosa	
↓	
Homogenisieren	0,05 mol/l Tris/HCl, pH 7,8
↓	
Ultrazentrifugation	40.000 x g, 4°C, 30 Minuten
↓	
Sephacryl S-200	0,1 mol/l Ammoniumformiatpuffer, pH 7,8
↓	
Trasylo1-Sepharose	Ablösung mit Essigsäure (0,1 mol/l, pH 3,5)
↓	
Dialyse	gegen 0,05 mol/l Tris/HCl-Puffer pH 7,4, 24 h, 4°C
↓	
Ultrafiltration	Amicon UM 10, 4°C, 6 at

Tab 8: Isolierungsschema von menschlichem Dickdarmkallikrein

Anreicherungsübersicht des menschlichen Dickdarmkallikreins

Nach dem oben beschriebenen Verfahren wurden zwei Isolierungen mit zwei verschiedenen Dickdarmpräparaten durchgeführt. Die Ergebnisse der einzelnen Schritte (Durchschnitt der beiden Isolierungen) zeigt Tab. 7.

Stufe	Volumen (ml)	Gesamt- protein (mg)	Gesamt- aktivität (Ac)* (mU)	Gesamt- aktivität (Bz)** (mU)	Spez. Aktivität (Ac)* (mU/mg) (a)	Spez. Aktivität (Bz)** (mU/mg) (b)	$\frac{a}{b}$	Reinigungs- faktor (Ac)*
Homogenat nach Ultrazentrifugation	715	1930	74400	169500	37,5	88	0,44	1
Sephacryl S-200-Eluat nach Gelfiltration	722	1232	46300	66200	38,5	53,6	0,7	1
Trasylol-Sepharose-Eluat nach Ablösung mit Essigsäure und Konzentrierung durch Ultrafiltration	16	1,6	1950	230	1251,3	148,7	8,4	33,4

Tab. 7: Anreicherungsübersicht des menschlichen Dickdarmkallikreins (HCK)
(Durchschnitt aus zwei Isolierungen)

*: Ac = AcPheArgOEt

** : Bz = BzArgOEt

Reinheitsskriterien

Die Reinheit der Dickdarmkallikrein-Präparation wurde mit zwei Polyacrylamidgel-Elektrophoreseläufen bei pH 7,3 und 8,9, 7,5% Gel nach Maurer [76] überprüft (Details der experimentellen Bedingungen; Kap. 4.2.3). Es ergab sich jeweils nur eine einzige Bande (Abb. 6).

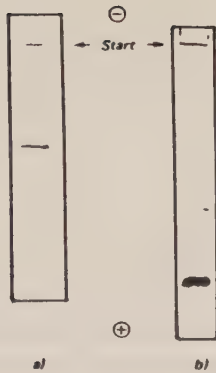


Abb 6: Polyacrylamidgel-Elektrophoresen von reinem menschlichem Dickdarmkallikrein

a) pH 7,3, 7,5% Gel, 140 Minuten, 300 V, 45 mA

b) pH 8,9, 7,5% Gel, 120 Minuten, 150 V, 95 mA

5.3 Charakterisierung des menschlichen Dickdarmkallikreins

5.3.1 Molekulargewichtsbestimmung

Molekulargewichtsbestimmung durch Gelfiltration

Die Untersuchungen wurden an einer Sephacryl S-200-Säule (140 x 1,8 cm), die mit 0,1 mol/l Ammoniumformiatpuffer, pH 7,8, äquilibriert und eluiert wurde, durchgeführt. Die Durchflußrate betrug 13 ml/h.

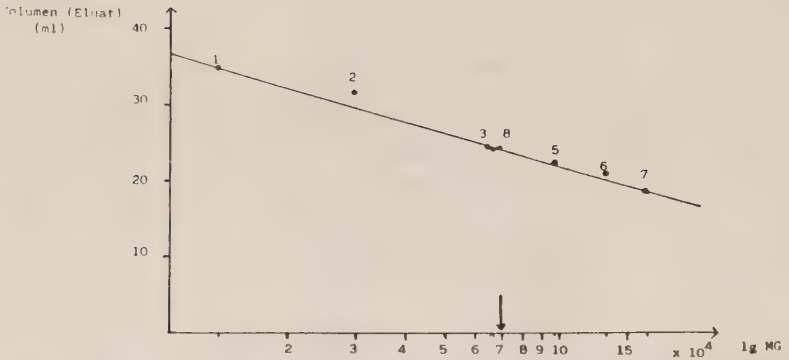


Abb 7: Bestimmung des Molekulargewichts von menschlichem Dickdarmkallikrein (HCK) mittels Gelfiltration an Sephacryl S-200. Vergleichssubstanzen: 1. Cytochrom C 13,4 kDa, 2. Carboanhydrase 30 kDa, 3. Rinderserumalbumin (BSA) 66 kDa, 4. Hämoglobin 68 kDa, 5. Phosphorylase b 98 kDa, 6. BSA-Dipolymer 132 kDa, 7. Gammaglobulin v. Rind 169 kDa, 8. Humankolonkallikrein

Das Molekulargewicht des menschlichen Dickdarmkallikreins (HCK) wurde zu 70.000 bestimmt (Abb. 7).

Molekulargewichtsbestimmung durch SDS-Elektrophorese

Das Molekulargewicht wurde außerdem noch mit Hilfe der SDS Elektrophorese nach Dunkert und Rueckert [15] bestimmt (4.2.3).



Abb. 8: SDS-Elektrophorese von menschlichem Dickdarmkallikrein (HCK) nach Reduktion mit Mercaptoäthanol

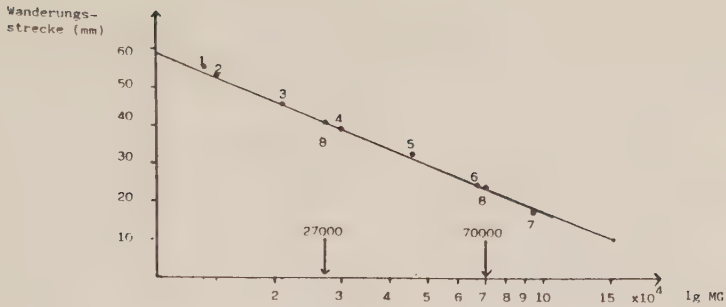


Abb. 9: Bestimmung des Molekulargewichts von menschlichen Dickdarmkallikrein (HCK) mittels SDS-Elektrophorese. Vergleichssubstanzen: 1. Cytochrom C 13,4 kDa, 2. Lysozym 14,3 kDa, 3. SBTI 21 kDa, 4. Carboanhydrase 30 kDa, 5. Ovalbumin 45 kDa, 6. BSA 68 kDa, 7. Phosphorylase 94 kDa, 8. Humankolonkallikrein

Das elektrophoretisch homogene menschliche Dickdarmkallikrein (HCK) zeigte nach Reduktion mit Mercaptoäthanol in der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese zwei Banden mit einem MG von 70.000 und 27.000 (Abb. 8 und 9).

5.3.2 Aminosäurezusammensetzung

Die menschliche Dickdarmkallikreinpräparation wurde bei 110°C mit 5,7 mol/l HCl 20, 40 und 80 Stunden hydrolysiert und am Durrum D 500 analysiert. Tab. 8 zeigt die Aminosäurezusammensetzung des menschlichen Dickdarmkallikreins im Vergleich zu Schweinepankreas- und menschlichen Harnkallikrein.

Aminosäuren	Schweinepankreas- β-Kallikrein (30)	menschl. Harn- kallikrein (54)	menschl. Dick- darmkallikrein
Asp	28	23	23
Thr	15	14	14
Ser	14	14	14
Glu	23	28	29
Pro	16	14	13
Gly	22	22	22
Ala	13	14	21
Cys	10	10	n.b.
Val	10	18	17
Met	4	4	4
Ile	12	8	8
Leu	20	20	21
Tyr	7	6	8
Phe	10	10	9
Lys	10	8	15
His	8	9	8
Arg	3	6	10
Trp	7	2	n.b.

Tab. 8: Aminosäurezusammensetzung verschiedener Gewebeskallikreine.
n.b. = nicht bestimmt

5.3.3 Stabilität des Kallikreins

Die Stabilität des reinen menschlichen Dickdarmkallikreins wurde bei 4°C, untersucht (Abb. 10).

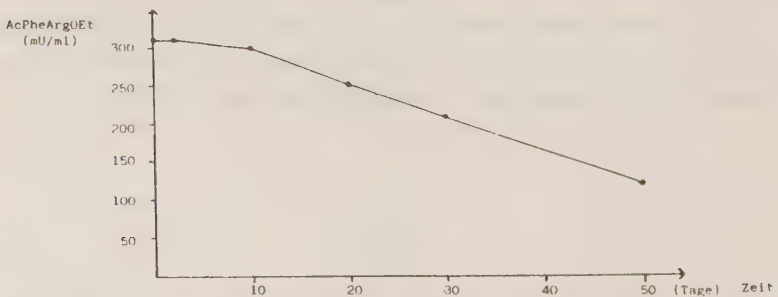


Abb. 10: Zeitlicher Aktivitätsverlust der HCK-Lsg. bei einer Lagerung von 4°C gemessen mit AcPheArgOEt

5.3.4 Enzymatische Eigenschaften

Wirkung auf Met-Lys-Bradykinin

Die Spaltung von Met-Lys-Bradykinin wurde mit einer modifizierten Methode nach Figarella und Greene [34] durchgeführt. Das Inkubationsgemisch (0,3 ml), das 30 ng Met-Lys-BK in 0,01 mol/l Tris/HCl, pH 7,8, 0,02 mol/l CaCl_2 , 0,1 mol/l KCl und das Enzym enthielt, wurde bei 25°C für 10, 20 und 30 Minuten inkubiert. Die Kininaktivität wurde als Bradykininäquivalente (Rattenuterustest (4.2.1)) bestimmt. Es wurden vergleichende Untersuchungen mit Rindertrypsin, menschlichen Urin- und Kolonkallikreinen durchgeführt (Abb. 11). Es wurde nur eine Hydrolyse von Met-Lys-Bradykinin durch Trypsin beobachtet, während menschliches Harnkallikrein und menschliches Dickdarmkallikrein das Substrat nicht zu spalten vermögen.

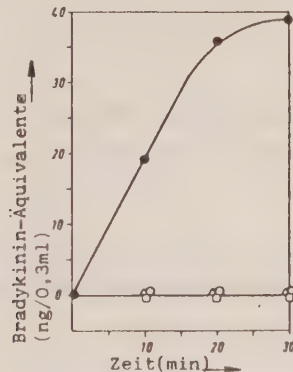


Abb. 11: Freisetzung von Bradykinin-Äquivalent aus Met-Lys-Bradykinin durch Rindertrypsin, menschliches Harn- und Kolonkallikrein.

- —●: Rindertrypsin (5 µg); ○ —○: menschliches Urinkallikrein (4 µg); △ —△: menschliches Dickdarmkallikrein (4 µg); □ —□: Met-Lys-BK-Kontrolle (kein Enzym im Inkubationsgemisch)

Hemmverhalten

Die Hemmung des menschlichen Dickdarmkallikreins wurde mit Trasylol und SBTI (4.2.1) durchgeführt. Das menschliche Dickdarmkallikrein (0,02 ml) wurde bei 37°C für 10 Minuten mit Inhibitorlösung (0,02 ml) vorinkubiert.

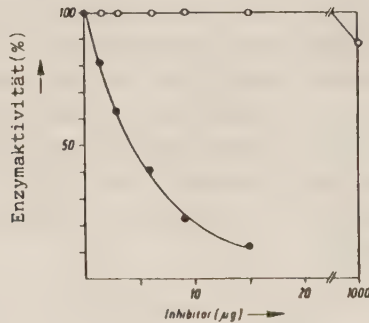


Abb. 12: Hemmung der HCK-Aktivität (300 mU/ml; Substrat: AcPheArgOEt); Inhibitor: Trasylol (●—●) und SBTI (○—○).

Wie aus der Hemmungskurve des menschlichen Dickdarmkallikreins mit Trasylol (Abb. 12) zu sehen ist, hemmt Trasylol die AcPheArgOEt-Aktivität des HCK sehr gut.

Isoliertes menschliches Dickdarmkallikrein (300 mU/ml, Substrat AcPheArgOEt) zeigt mit SBTI in physiologischen Konzentrationen keine Hemmung. Erst bei Zugabe von 1 mg Inhibitor zeigte sich eine leichte Hemmung von ca. 10% (Abb. 12).

DFP-Inaktivierung [33]

Die DFP-Inaktivierung wurde wie in Abb. 13 dargestellt durchgeführt.

Es errechnet sich ein K' von $5,625 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$. Die DFP-Konzentration beträgt $1,4 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$. Daraus ergibt sich eine bimolekulare Geschwindigkeitskonstante K von $4 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

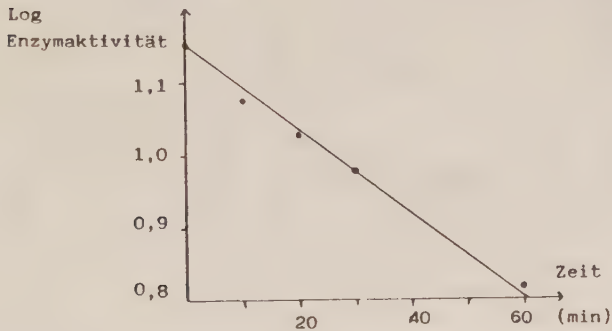


Abb. 13: Inaktivierung des menschlichen Dickdarmkallikreins durch DFP ($1,4 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$); Temp. 25°C , pH 7,2

Wirkung auf den Blutdruck des Hundes

Die hypotensive Eigenschaft der Kallikreine kann mit Hilfe von Standardsubstanzen am narkotisierten, atropinisierten Hund quantitativ bestimmt werden (Kap. 4.2.1). Die Effektivität der hypotensiven Wirkung des isolierten Kallikreins lag in der Größenordnung des menschlichen Harnkallikreins, wohingegen die gleiche Blutdruckerniedrigung beim Schweinepankreas-kallikrein erst bei der 7-8fachen Menge auftrat (Tab. 9).

Art des Kallikreins	Kallikreinnengen, die die gleiche Senkung des Blutdruckes verursachen (μg)
menschliches Harnkallikrein	0,08
menschliches Dickdarmkallikrein	0,15
Schweinepankreas-kallikrein	1,0

Tab 9: Vergleich der Blutdrucksenkung beim Hund durch verschiedene Gewebskallikreine

5.3.5 Immunologische Eigenschaften

Immunologische Untersuchungen nach Ouchterlony

Jeweils 5 μl des gereinigten Antikörperserums anti-Harnkallikrein (anti-HUK), anti-Humantrypsin und anti-Humanplasmakallikrein wurden in das zentrale und ein peripheres Stanzloch aufgetragen. Radial dazu wurden Verdünnungsreihen vom isolierten menschlichen Dickdarmkallikrein gegeben.

Präzipitate bildeten sich nur mit Kaninchen-Gammaglobulinen, gerichtet gegen menschliches Urinkallikrein, während keine Immunpräzipitationsbanden mit

IgG-Antikörpern von Kaninchen, gerichtet gegen menschliches Trypsin und gegen menschliches Plasmakallikrein entstanden (Abb. 14).

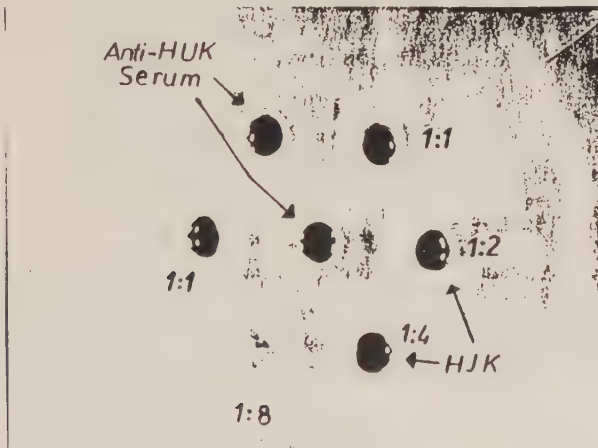


Abb. 14: Immundiffusion nach Ouchterlony von HJK-Verdünnungen gegen HUK-Antikörper-Serum

Hemmung der Kininfreisetzung mit Antikörpern

Die Freisetzung der Kinine kann mit spezifischen Antikörpern, die gegen Gewebeskallikrein gerichtet sind, gehemmt werden. Dazu wurden aus Antiseren isolierte IgG-Fraktionen gewonnen und in Hemmstudien eingesetzt. Die Kininfreisetzung aus HMW-Kinogen durch HCK konnte nur mit Antikörpern gegen HUK gehemmt werden. Antikörper gegen Humantrypsin und menschliches Serumkallikrein beeinflussen diese Aktivität des menschlichen Dickdarmkallikreins nicht (Abb. 15).

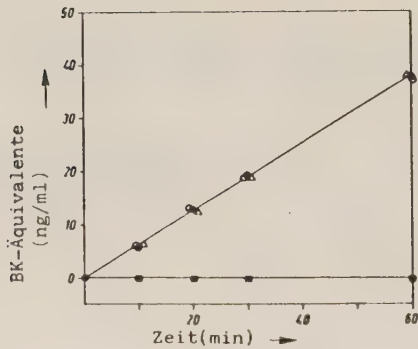


Abb. 15: Hemmung der HCK-induzierten Kininfreisetzung aus HMW-Kininogen durch Kaninchenantikörper, gerichtet gegen HUK (■—■), HSK (○—○) und menschliches Trypsin (△—△). (●—●): Freisetzung der Kinine durch HCK ohne Gammaglobuline.

Radioimmunoassay mit Antikörpern gegen menschliches Urin-Kallikrein

Im Radioimmunoassay für menschliches Harnkallikrein zeigte sich eine immunologische Kreuzreaktion mit parallelen Bindungskurven für menschliches Urin- und Dickdarmkallikrein (Abb. 16). Diese Kreuzreaktion im RIA wurde auch für menschliches Harn- und Pankreaskallikrein gefunden [56], während HSK und menschliches Trypsin keine Bindung zeigten.

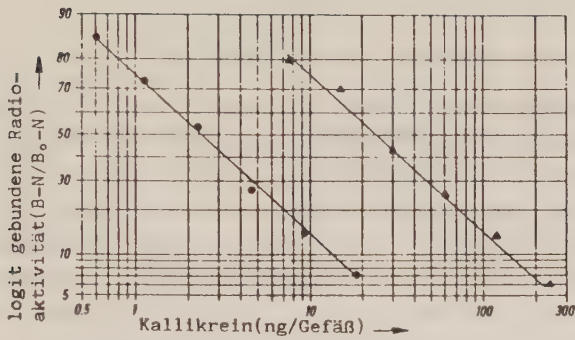


Abb. 16: Kreuzreaktion von menschlichem Dickdarmkallikrein (Δ — Δ) im Radioimmunoassay für menschliches Harnkallikrein ($\bullet$ — $\bullet$). Die exakte Konzentration von HCK war nicht bekannt. Ordinate: B = gebundene Radioaktivität; B_0 = gebundene Radioaktivität in Abwesenheit von nicht-markierten Antigen; N = unspezifisch gebundene Radioaktivität. Das Diagramm stellt eine Logit-log-Transformation dar.

6. DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Isolierung des menschlichen Dickdarmkallikreins

Die hier beschriebene Methode der Isolierung ist ein relativ einfaches Verfahren, um menschliches Dickdarmkallikrein mit verhältnismäßig geringem Aufwand und in hoher Ausbeute zu isolieren.

Auf das mehrmalige Homogenisieren des Gewebes in Lösungen mit geringer Ionenstärke (Tab. 2), das Billing [4] benutzte, wurde aufgrund der relativen Instabilität des Enzyms verzichtet und gleich mit 1 mol/l NaCl enthaltenem Puffer homogenisiert. Der Umstand, daß durch Zugabe von 1 mol/l NaCl in den Homogenisierungspuffer die Ausbeute an esterolytischer Aktivität um ein Vielfaches anstieg, läßt die Vermutung nahe, daß das Kallikrein zumindest teilweise in gebundener Form im Gewebe vorhanden ist.

Bei der Gelfiltration an Sephacryl S-200 wurde eine gute Auftrennung der Proteine erreicht. Zur weiteren Reinigung wurde die Affinitätschromatographie an trägergebundenem Aprotinin (Trasylol^R) zur Isolierung des menschlichen Dickdarmkallikreins angewandt.

Mit der Ablösung durch 0,1 mol/l Essigsäure (pH 3,5) des an die Trasylol-Sephacryl-Säule gebundenen Kallikreins wurde eine geeignete Methode gefunden. Zwar war die Ausbeute gering, aber die Affinitätschromatographie erbrachte in dem dreistufigen Isolierungsverfahren den anteilmäßig größten Reinigungserfolg (Tab. 7). Nach diesen Reinigungs- und Anreicherungsschritten lieferte das menschliche Dickdarmkallikrein in der Disk-Elektrophorese ein homogenes Präparat. Eine weitere Reinigung war nicht mehr erforderlich, da Enzymbeimischungen nicht mehr vorhanden zu sein schienen. Der Reinheitsgrad des isolierten Dickdarmkallikreins erwies sich für die durchzuführenden Versuche als ausreichend.

Auch wurde eine zufriedenstellende Stabilität (Aufbewahrung bei 4°C) erhalten. Die Kallikreinflösung ist in den ersten 10 Tagen praktisch stabil.

Mit zunehmender Lagerzeit fällt die Aktivität des Enzyms stärker ab und beträgt nach 50 Tagen ca. 50% des Ausgangswertes (Abb. 10).

Der Quotient der spezifischen Aktivitäten der AcPheArgOEt- und BzArgOEt-Spaltung wurde während der Isolierungsschritte größer. Dies legt die Vermutung nahe, daß während der Präparation Proteasen abgetrennt wurden, die vorwiegend BzArgOEt spalten, aber weniger AcPheArgOEt, (AcPheArgOEt ist für das menschliche Harnkallikrein 46 mal empfindlicher als BzArgOEt). Für menschliches Dickdarmkallikrein besitzt AcPheArgOEt also auch eine höhere Substratspezifität als BzArgOEt.

Eigenschaften des menschlichen Dickdarmkallikreins

Zum Nachweis, ob die isolierte Dickdarmkininogenase tatsächlich ein Organkallikrein ist, war die Abgrenzung der Enzympräparation von Trypsin, Plasmakallikrein und anderen trypsinähnlichen Proteasen, die im menschlichen Verdauungstrakt vorkommen können, notwendig. Dies konnte mit Hilfe des Hemmspektrums erreicht werden, da bestimmte Inhibitoren sehr spezifisch wirken können. Auch in immunologischer Hinsicht zeigen Kallikreine nicht nur ein speziesspezifisches, sondern zum Teil auch organspezifisches Verhalten [45, 64]. So besteht keine immunologische Kreuzreaktion zwischen Antikörpern gegen Plasmakallikrein und Organkallikreinen [64]. Dagegen können die Organkallikreine mit immunchemischen Methoden nicht unterschieden werden [64, 85].

Andererseits sollte die Zuordnung des isolierten menschlichen Dickdarmkallikreins zur Gruppe der Organkallikreine mit vergleichenden Untersuchungen aufgezeigt werden. So basiert die Unterscheidung zwischen Plasma- und Organkallikrein u.a. auf der unterschiedlichen Hemmbarkeit der beiden Enzyme; man kann sie mit Hilfe von Inhibitoren unterscheiden. So hemmen SBTI und OMTI Plasmakallikrein, aber keine Gewebekallikreine (z.B. Harn-, Submandibularis- oder Pankreaskallikrein) [117, 118]. Auch können durch Inhibitoren Verunreinigungen mit anderen ähnlichen Enzymen nachgewiesen werden. Wird die Aktivität durch einen Inhibitor, der z.B. Kallikrein nicht zu hemmen vermag, vermindert, so müssen zusätzlich noch eine oder mehrere kallikreinähnliche

Proteinasen vorhanden sein, die durch diesen Inhibitor gehemmt werden. So scheinen die Widersprüchlichkeiten in den Eigenschaften des isolierten Kallikreins bei den verschiedenen Autoren zum Teil in der ungenügenden Reinheit der untersuchten Proben, aber auch in den Speziesunterschieden und den Unbeständigkeiten der Enzyme, zu liegen.

Anhand folgender Kriterien konnte das menschliche Dickdarmkallikrein von anderen Proteasen differenziert werden:

1. Die Molekulargewichtsbestimmung mit der Gelfiltration an Sephacryl S-200 und mit der Dodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese nach Reduktion mit Mercaptoäthanol ergab Werte von 70.000 und 27.000
Das hier gefundene Molekulargewicht von 70.000 stimmt mit den von Seki et al. [104] und Billing [4] ermittelten Angaben überein. Das isolierte Enzym kann also kein menschliches Plasmakallikrein sein, da dies ein Molekulargewicht von ca. 90.000 besitzt [6].
2. Im radialen Immundiffusionstest nach Ouchterlony präzipitiert das menschliche Dickdarmkallikrein mit Antikörpern gegen menschliches Harnkallikrein, während keine Präzipitationslinien mit Antikörpern gegen menschliches Trypsin und Plasmakallikrein gefunden wurden. Eine Identität des isolierten Dickdarmkallikreins mit Trypsin bzw. Plasmakallikrein ist damit ausgeschlossen. Die große Ähnlichkeit und nahe Verwandtschaft des HCK zum HUK bzw. zu den Organkallikreinen konnte mit diesem Test ebenfalls bekräftigt werden. Auch die Theorie von Seki und Erdös [104], daß der Darm ein Bildungsort der Plasmakallikreine sein könnte, ist somit unwahrscheinlich.
3. Die Kininfreisetzung aus HMW-Kininogen durch menschliches Dickdarmkallikrein konnte nur mit Antikörpern, die gegen menschliches Harnkallikrein gerichtet waren, gehemmt werden, dagegen wurde die Aktivität nicht durch Antikörper gegen Humantrypsin und Humanplasmakallikrein beeinflußt. Jeder Antikörper hemmt nur die durch das Enzym verursachte Kininfreisetzung, gegen das er gerichtet ist.

4. Die esterolytische Aktivität des menschlichen Dickdarmkallikreins konnte durch die Zugabe von sehr geringen Mengen (Aprotinin) völlig gehemmt werden. Auch das alle Serinproteasen hemmende Diisopropylflourophosphat (DFP) konnte vollständig HCK hemmen, während der Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor (SBTI) - ein hochaktiver Hemmstoff für Trypsin, Chymotrypsin, Plasmin, Akrosin und Plasmakallikrein - keinerlei Wirkung auf die enzymatische Aktivität des menschlichen Dickdarmkallikreins zeigte. Die von Seki [104] und Billing [4] gefundene Hemmung mit SBTI konnte nicht bestätigt werden.
5. Das inaktive Substrat Met-Lys-Bradykinin kann von Trypsin durch Abspalten des Met-Lys-Restes in das aktive Bradykinin übergeführt werden, während diese Verbindung durch Gewebeskallikreine (menschliches Harnkallikrein) nicht hydrolysiert wird. Somit kann zwischen Trypsin und Kallikrein unterschieden werden. Auch für das menschliche Dickdarmkallikrein wurde keine Bradykininfreisetzung beobachtet und somit Trypsinverunreinigungen des isolierten Kolonkallikreins ausgeschlossen.

Die nahe Verwandtschaft des isolierten Kallikreins zu anderen Gewebeskallikreinen wurde durch folgende Ergebnisse belegt:

1. Alle Serinproteasen können durch den Phosphorsäureester Diisopropylflourophosphat (DFP) irreversibel gehemmt werden [31, 140]. Die Hemmung der Serinhydrolasen durch DFP ist aber ein zeitlich abhängiger Prozeß. So wird z.B. Trypsin viel schneller durch DFP gehemmt als Schweinepankreas-kallikrein. Ein Maß für diese zeitliche Inaktivierung gibt die Geschwindigkeitskonstante. Sie ist für die einzelnen Serinproteasen verschieden. Die bimolekulare Geschwindigkeitskonstante für die Dickdarmkallikreinhemmung mit DFP liegt im Bereich der bekannten Gewebeskallikreine und unterscheidet sich deutlich von den Werten, die für menschliches Trypsin und Plasmakallikrein bestimmt wurden (Kap. 5.3.4 und Tab. 10).

Serinproteasen	Geschwindigkeitskonstante K $l \cdot mol^{-1} \cdot min^{-1}$
Menschliches Pankreaskallikrein	2
Menschliches Dickdarmkallikrein (HDK)	4
Menschliches Harnkallikrein (HUK)	9 ± 2
Schweinepankreaskallikrein (34)	8 ± 1
Menschliches Plasmakallikrein (59)	320 ± 20
Trypsin (28)	300
Chymotrypsin (28)	2700
Acetylcholinesterase (28)	13000

Tab. 10: Geschwindigkeitskonstanten für die Hemmung von verschiedenen Serinproteasen durch Diisopropylfluorophosphat (pH 7,2, 25°C)

2. Im spezifischen HUK-Radioimmunoassay, wurden Kreuzreaktionen für menschliches Pankreaskallikrein gefunden während menschliches Plasmakallikrein und Humantrypsin bei dieser Bestimmungsmethode keine Reaktionen zeigten. Parallele Bindungskurven wurden zwischen menschlichem Dickdarmkallikrein und menschlichem Harnkallikrein in diesem Radioimmunoassay gefunden. Die Kreuzreaktion war so ausgeprägt, daß diese beiden Gewebekallikreine in diesem immunologischen Test nicht zu unterscheiden waren.
3. Die Aminosäureanalyse des menschlichen Dickdarmkallikreins ergab eine hohe quantitative Übereinstimmung mit den Aminosäurezusammensetzungen bekannter Organkallikreine. Vor allem bestehen viele Ähnlichkeiten mit dem menschlichen Harnkallikrein. So sind die Werte für Asp, Thr, Ser, Gly, Met, Ile und His der beiden Kallikreine identisch. Auch bestehen für die anderen Aminosäuren nur geringe quantitative Unterschiede (Tab. 8).

4. Bei der Bestimmung der Blutdrucksenkung beim Hund ist menschliches Harnkallikrein über 12 mal empfindlicher als Schweinepankreas-kallikrein. Die i.v.-Gabe des menschlichen Dickdarmkallikreins in Hunde rief ähnlich quantitativ große Wirkungen hervor, verglichen mit denen von menschlichem Harnkallikrein.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen demonstrieren, daß sich die isolierte Dickdarmkininogenase in wesentlichen Eigenschaften von Humanplasmakallikrein und Humantrypsin unterscheidet. Verunreinigungen mit anderen Argininester-spaltenden Enzymen, wie z.B. Plasmin und Thrombin, dürften ausgeschlossen sein.

Die große Übereinstimmung des menschlichen Dickdarmkallikreins mit den Daten bereits bekannter Organkallikreine ordnet es dieser Gruppe der Kallikreine zu.

Zwar bewegen sich die Molekulargewichte der bekannten menschlichen Organkallikreine in einem Bereich von 25.000 bis 45.0000, aber das menschliche Harnkallikrein mit einem Molekulargewicht von 64.000 [52] besitzt somit ein ähnliches Molekulargewicht wie das menschliche Dickdarmkallikrein.

Ob dieses Enzym direkt im Dickdarm synthetisiert oder aber nur in den Pankreassaft sezerniert und später in die Darmwand resorbiert wird, müssen zukünftige Untersuchungen klären. Die Möglichkeit, daß das im Dickdarm gefundene Kallikrein zum Teil organgebunden, zum Teil resorbiertes Pankreas- und Plasmakallikrein sein könnte, würde die bei verschiedenen Isolierungsverfahren gewonnenen unterschiedlichen Ergebnisse erklären können.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] ABELOUS, I.E.,
BARDIER, E.: Les substances hypotensive de l'urine humaine normale. Compt. Rend. Soc. Biol. 66, 1909, S. 511-512
- [2] AMUNDSEN, E.,
NUSTAD, K: Kinin-forming and destroying activities of cell homogenates. J. Physiol. 179, 1965, S. 479-488
- [3] AUSTEN, K.F.,
FEARON, D.T.: A Molecular Basis of Activation of the Alternative Pathway of Human Complement. Adv. Exp. Med. Biol. 120 B, 1979, S. 3-17
- [4] BILLING, A.: Isolierung und Charakterisierung eines Kallikreins aus menschlicher Kolon-Schleimhaut, 1977
- [5] BURGER, A., LEMBECK, F.,
WAGNER, J.: Serotonin und Kininogenase - Aktivität in Fraktionen der Dünndarmschleimhaut des Kaninchens. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. und exp. Path. 261, 1968, S. 412-421
- [6] COLMAN, R.W.,
BAGDASARIAN, A.: Human Kallikrein and Prekallikrein. Methods Enzymol. 45, 1976, S. 303-322
- [7] CORTHORN, J., IMANARI, T.,
YOSHIDA, H., KAIZU, T.,
PIERCE, J.V., PISANO, J.J.: Isolation of Prokallikrein from Human Urine. Adv. Exp. Med. Biol. 120 B, 1979, S. 575-579
- [8] DENNHARDT, R.,
HABERICH F.I.: Effect of Kallikrein on the Absorption of Water, Electrolytes, and Hexoses in the Intestine of Rats. In: Haberland, G.L. und Rohen, J.W. (EDS): Kininogenases - Kallikrein 1, Stuttgart 1973, Schattauer, S. 81-88,

- [9] DERKX, H.M.,
TANG-TJIONG, H.L.:
MAN IN't VELD, A.J.,
SCHALEKAMP, M.P.A.,
SCHALEKAMP, M.A.D.H.: Activation of Inactive Plasma Renin
by Tissue Kallikreins, 1979

- [10] DIETZE, G.,
WICKLMAYR, M.: Effekt von Bradykinin auf die Glucose-
aufnahme durch die Muskulatur beim
Menschen. Klin. Wochenschrift 55,
1977, S. 357-358

- [11] DIETZE, G., WICKLMAYR, M.,
BÖTTGER, J., SCHIFMANN, R.,
GEIGER, R., FRITZ, H.,
MEHNERT, H.: The Kallikrein-Kinin-System and Muscle
Metabolism: Biochemical Aspects. Agents
and Actions 10, 1980, S. 335-338

- [12] DIETZE, G., WICKLMAYR, M.,
MAYER, L.: Evidence for a Participation of the
Kallikrein-Kinin-System in the Regula-
tion of Muscle Metabolism during
Hypoxia. Hoppe Seyler's Z. Physiol.
Chem. 358, 1977, S. 633-638

- [13] DITTMANN, B., LOTTSPEICH, F.,
HENSCHEN, A., FRITZ, H.: Structural and Functional Aspects
of Human High-Molecular Weight
(HMW) Kininogen. Proteins and Related
Subjects 28, 1980, S. 213-216

- [14] DONALDSON, V.H.,
GLUECK, H.J., MILLER, M.A.,
MOVAT, H.Z., HABAL, F.: Kininogen Deficiency in Fitzgerald
Trait: Role of High Molecular Weight
Kininogen in Clotting and Fibrinolysis.
J. Lab. Clin. Med. 87, 1976, S. 327-337

- [15] DUNKERT, K.J.,
RUECKERT, R.R.: Observations on molecular weight
determination on polyacrylamide gel.
J. Biol. Chem. 244, 1969, S. 5.074-
5.080

- [16] EHRET, W.: Die Primärstruktur des Kallikreins
aus Schweinepankreas. Dissertation,
Fachbereich Chemie und Pharmazie,
München 1976

- [17] EISEN, V.,
NORONHA-DUTRA, A.: Effects of Kallikrein and Bradykinin on uptake and release of substance by peritoneal macrophages. In: Haberland, G.L. et al. (Eds.): Kininogenases-Kallikrein 4, Schattauer, Stuttgart 1977
- [18] ELLIOT, D.F., HORTON, E.W.,
LEWIS, G.P.: Actions of pure bradykinin. J. Physiol. (Lond.) 153, 1960, S. 473-480
- [19] ELLIOT, D.F.,
LEWIS, G.P.: Methionyl-lysyl-Bradykinin, a new Kinin from ox blood. Biochem. J. 95, 1965, S. 437
- [20] ERDÖS, E.G.: Enzymes that inactivate active polypeptides. Biochem. Pharmacol. 8, 1961, S. 112
- [21] ERDÖS, E.G.: Kininogenases-Handbook of experimental pharmacology, Vol. 25, Springer, Berlin 1970, S. 82-249
- [22] ERDÖS, E.G.: The Kinins. A status report. Biochem. Pharmacol. 25, 1976, S. 1563
- [23] ERDÖS, E.G.: Kininases Handbook, Exp. Pharmacol. 25, Suppl. (Erdös, E.G., ed.), Springer-Verlag, Berlin 1979, S. 428-488
- [24] ERDÖS E.G.: Bradykinin, Kallidin and Kallikrein. Handbook Exp. Pharmacol. 25, Suppl., Springer-Verlag, Berlin 1979 b
- [25] ERDÖS, E.G.,
WILDE, A.F. (Eds.): Bradykinin, Kallidin and Kallikrein. Handbook of Experimental Pharmacology, Vol. 25, Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg/New York, 1970
- [26] ERHARDT, F., MARSCHNER, J., Verbesserung und Qualitätskontrolle der radioimmunologischen Thyreotropin-Bestimmung. Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 11, 1973, S. 381-387

- [27] FARNEY, D.E.,
GOLD, A.M.: Sulfonyl Fluorides as inhibitors of Esterase J. Rates of reaction with acetyl cholinesterase, alphachymotrypsin and Trypsin. J. Amer. Chem. Soc. 85, 1963, S. 997-1000
- [28] FASTH, S.,
HULTEN, L.: The effect of bradykinin on intestinal motility and blood flow. Acta chir. scand. 139, 1973 b, S. 699-705
- [29] FASTH, S., HULTEN, L.,
JOHNSON, B.J., NORDGRAN, S., ZEITLIN, I.J.: Mobilization of colonic Kallikrein following pelvic nerve stimulation in the atropinized Cat. J. Physiol. 285, 1978, S. 471-478
- [30] FIEDLER, F., EHRET, W.,
GODEC, G., HIRSCHAUER, C., KUTZBACH, C.,
SCHMIDT-KASTNER, G., TSCHECHE, H.: The Primary Structure of Pig Pancreatic Kallikrein B. In: Haberland, G.L. et al. (Eds.), Kininogenases-Kallikrein 4, Schattauer Verlag, Stuttgart, 1977 S. 7-14
- [31] FIEDLER, F., FINK, E.,
TSCHECHKE, H., FRITZ, H.: Procine Glandular Kallikreins. Meth. Enzymol., 1981
- [32] FIEDLER, F., GEIGER, R.,
HIRSCHAUER, C., LEYSATH, G.: Peptide Esters and Nitroanilides as Substrates for the Assay of Human Urinary Kallikrein. Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 359, 1978, S. 1667-1673
- [33] FIEDLER, F., MÜLLER, B.,
WERLE, E.: The Inhibition of Porcine Pancreas Kallikrein by Di-Isopropyl-Fluorophosphate. European J. Biochem. 10, 1969, S. 419-425
- [34] FIGARELLA, C., SAMPAIO, M.U.,
GREENE, L.J.: Comparison of the Kininogenase Activity of Human Pancreatic Trypsins and Porcine Kallikrein on Met-Lys-Bradykinin and Human Plasma Kininogen. Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 359, 1978, S. 1225-1228
- [35] FINK, E.: Untersuchungen zur Wirkungsweise des Gewebeskallikreins, Habilitationsschrift, München 1979

- [36] FINK, E, GEIGER, R.,
WITTE, J., BIEDERMANN, S.,
SEIFERT, J. FRITZ, H.:
In Enzymatic release of vasoactive
peptides (Gross, F., Vogel, G., Eds.)
Raven Press, New York, Biochemical,
Pharmacological and Functional Aspects
of Glandular Kallikrein, 1980, S. 101-115

- [37] FISHLOCK, D.J.:
Effect of bradykinin on the human
isolated small and large intestine. *Nature*
(London) 212, 1966, S. 1533-1535

- [38] FOLIN, E.,
CIOCALTEAU, V.:
On Tyrosine and Tryptophane Determina-
tions in Proteins. *J. Biol. Chem.* 73,
1927, S. 627-650

- [39] FRANKISH, N.H.,
ZEITLIN, I.J.:
The assay of tissue kallikrein in rat
intestine. *Br. J. Pharm.* 59, 1977 a,
S. 517

- [40] FRANKISH, N.H.,
ZEITLIN, I.J.:
Kallikrein release from rat duodenum
stimulated by bile acids and other
factors. *J. Physiol. (Lond.)* 273, 1977 b,
S. 60-61

- [41] FRANKISH, N.H.,
ZEITLIN, I.J.:
The effect of diet on tissue levels
of Kinin-forming enzyme in blood-free
rat gastro-intestinal tract. *J. Physiol.*
298, 1980, S. 361-370

- [42] FREY, E.K.:
Zusammenhänge zwischen Herzarbeit
und Nierentätigkeit, *Arch. Klin. Chir.*
142, 1926, S. 663-669

- [43] FREY, E.K.
KRAUT, H.:
Ein neues Kreislaufhormon und seine
Wirkung, *Arch. Exptl. Pathol. Pharmacol.*
133, 1928, S. 1-56

- [44] FREY, E.K.,
KRAUT, H., WERLE, E.:
Kallikrein-Padutin, Ferdinand Enke
Verlag, Stuttgart, 1950, S. 6-8 und
32-34

- [45] FREY, E.K.,
KRAUT, H., WERLE, E.: Das Kallikrein-Kinin-System und seine Inhibitoren, Ferdinand-Enke-Verlag, Stuttgart, 1968
- [46] FRITZ, H.: Glandular and Plant Kallikrein Inhibitors. In: Pisano J.J., Austen, K.F. (Eds.). Chemistry and Biology of the Kallikrein-Kinin-System in Health and Disease, 1976, S. 181-193
- [47] FRITZ, H., FINK, E.,
TRUSCHEIT, E.: Kallikrein Inhibitors. Fed. Proc. 38, 1979, S. 2753-2759
- [48] FRITZ, H., WUNDERER, G.,
KUMMER, K., HEIMBURGER, N.,
WERLE, E.: α_1 -Antitrypsin und C₁-Inaktivator: Progressiv-Inhibitoren für Serumkallikrein von Mensch und Schwein. Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 353, 1972, S. 906-910
- [49] FRITZ, H., TRAUTSCHOLD, I.,
WERLE, E.: Protease-Inhibitoren in: Bergmeyer, H.U. (Ed.): Methoden der enzymatischen Analyse, Verlag Chemie, Weinheim, 1974, S. 1108-1116
- [50] GEIGER, R.: The Kallikrein-Kinin-Systems 1982
- [51] GEIGER, R.
FRITZ, H.: Human Urinary Kallikrein, Meth. Enzymol., 1981
- [52] GEIGER, R., MANN, K.,
BETTEL, T.: Isolation of Human Urinary Kallikrein by Affinity chromatography, J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 15, 1977, S. 479-483
- [53] GEIGER, R., STUCKSTEDTE, U.,
CLAUSNITZER, B., FRITZ, H.: Progressive inhibition of human glandular (urinary) Kallikrein by human serum and identification of the progressive antikallikrein as α_1 -Antitrypsin. Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 362, 1981, S. 317-325

- [54] GEIGER, R., STUCKSTEDTE, U., FÖRG-BREY, B., FINK, E.: Human Urinary Kallikrein-Biochemical and Pyhsiological Aspects. In: Fujii, S. et al., (Eds.), Kinins II: Biochemistry, Pathophysiology and Clinical Aspects, 1979, S. 235-244, Plenum Publishing Corporation
- [55] GEIGER, R., STUCKSTEDTE, U., FRITZ, H.: Isolation and Characterization of Human Urinary Kallikrein. Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 361, 1980, S. 1003-1016
- [56] GEIGER, R.: persönliche Mitteilungen
- [57] GELLER, R.G., MARGOLIUS, H. S., PISANO, J.J., KEISER, H.R.: Effects of mineralocorticoids, altered sodium intake, and adrenalectomy on urinary Kallikrein in rats. Circ. Res. 31, 1972, S. 857-861
- [58] GREENWOOD, F.C., HUNTER, W.M., GLOVER, J.: The Preparation of ¹³¹I-Labeled Human Growth Hormon of High Specific Radio-activity. Biochem. J. 89, 1963, S. 114-123
- [59] HABERLAND, G.L.: Introduction. In: Haberland, G.L., Rohen, J.W. (Eds.), Kallikrein-Kininogenases 1, Schattauer-Verlag, Stuttgart 1973, S. 1-4
- [60] HABERLAND, G.L.: Proteinaseinhibitoren - neue Aspekte, in: Pharmaberichte Bayer 19, S. 18-23
- [61] HADDY, F.I., EMERSON, Jr. T.E., SCOTT, I.B., DAUGHERTY, Jr. R.M.: The Effect of the Kinins on the Cardio-vascular System. In: Erdös, E.G., Wilde, A.F. (Eds.), 1970, S. 362-384
- [62] HEBER, H., GEIGER, R., HEIMBURGER, N.: Human Plasma Kallikrein: Purification, Enzyme Characterization and Quantitative Determination in Plasma. Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 359, 1978, S. 659-669

- [63] HIRSCH, E.F., NAKAJIMA, T., OSHIMA, G., ERDÖS, E.G., HERMANN, C.M.: Kinin system responses in sepsis after trauma in man. J. Surg. Res. 17, 1974, S. 147-153
- [64] IMANARI, T., KAIZU, T., YOSHIDA, H., YATER, K., PIERCE, S.V., PISANO, J.J.: Radiochemical Assays for Human Urinary, Salivary and Plasma Kallikrein. In: Pisano, J.J. and Austen, F., 1976, S. 205-213
- [65] KARLSON, P.: Kurzes Lehrbuch der Biochemie, 330, Thieme, Stuttgart 1974
- [66] KATO, H., HAN, Y.N., IWANAGA, S., HASHIMOTO, N., SUGO, T., FUJII, S., SUZUKI, T.: Mammalian plasma Kininogens: their structures and functions. In: Haberland, G.L. et al. (Eds.), Kallikrein-Kininogenases 4, Schattauer, Stuttgart 1977, S. 63-72
- [67] KRAUT, H., FREY, E.K., BAUER, E.: Über ein neues Kreislaufhormon, Z. Physiol. Chem. 175, 1928, S. 97-114
- [68] KRAUT, H., FREY, E.K., WERLE, E.: Der Nachweis eines Kreislaufhormons in der Pankreasdrüse. Z. Physiol. Chem. 189, 1930, S. 97-106
- [69] LARAGH, J.H., CASE, D.B., ATLAS, S.A., SEALEY, J.E.: Captopril Compared with other Antirenin System Agents in Hypertensive Patients: its Triphasic Effect on Blood Pressure and its Use to Identify and Treat the Renin Factor. Hypertension 2, 1980, S. 586-593
- [70] LOTTSPEICH, G., GEIGER, R., HENSCHEN, A., KUTZBACH, C.: N-Terminal Amino Acid Sequence of Human Urinary Kallikrein. Homology with other Serine Proteases. Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. Bd. 360, 1979, S. 1947-1950
- [71] LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, J.: Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. J. Biol. Chem. 193, 1951, S. 265-275

- [72] MANN, K.,
GEIGER, R.: Radioimmunoassay of Human Urinary Kallikrein. In: Haberland, G.L. et al. (Eds.), Kallikrein-Kininogenases 4, Schattauer, Stuttgart 1977, S. 55-61

- [73] MANN, K., GEIGER, R.,
GÖRING, W., LIPP, W.,
FINK, E., KEIPERT, B.
KARL, H.J.: Radioimmunoassay of Human Urinary Kallikrein. J. Clin. chem. Clin. Biochem. 18, 1980, S. 1-7

- [74] MANN, K., GEIGER, R.,
WERLE, E.: A Sensitive Kinin liberating Assay for Kininogenase in rat urine, isolated Glomeruli and Tubules of Rat Kidney. Adv. Exp. Med. Biol. 70, 1976, S. 65-73

- [75] MARSCHNER, I., ERHARDT,
F., SCRIBA, P.C.: Calculation of the Radioimmunoassay Standard Curve by "Spline Function". In: Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine, Vol. 1, 1974, S. 111-112, Intern. Atomic Energy Agency, Wien

- [76] MAURER, H.R.: Disc Electrophoresis, 2. Auflage, Walter de Gruyter, Berlin 1971

- [77] McGIFF, J.C., TERRAGNO, D.A.,
TERRAGNO, N.A., COLINA, J.,
NASJLETTI, A.: Prostaglandins as modulators and mediators of Kinins. in: Pisano, J.J., Austen, F. (Eds.), 1976, S. 267-273

- [78] MENG, K.,
HABERLAND, G.L.: Influence of Kallikrein on Glucose Transport in the Isolated Rat Intestine. In: Haberland, G.L., Rohen, J.W. (Eds.), Kallikrein-Kininogenases 1, 1973, S. 75-80

- [79] MEYER, A.,
WERLE, E.: Pathogenese, Diagnostik, Klinik und Therapie der Erkrankungen des exokrinen Pankreas, In: Henning, N., Heinkel, K., Schön, A., Schattauer, Stuttgart 1964, S. 299

- [80] MORIWAKI, C.,
FUJIMORI, H.: Further Observations on the Influence of the Kallikrein-Kinin-System on the Intestinal Absorption. In: Haberland, G.L. et al., Kallikrein-Kininogenases 3, Schattauer, Stuttgart 1975, S. 57-62

- [81] MORIWAKI, C.,
FUJIMORI, H., TOYONO, Y.: Intestinal Kallikrein and the Influence of Kinin on the Intestinal Transport. In: Haberland, G.L. et al. (Eds.), Kallikrein-Kininogenases 4, Schattauer, Stuttgart 1977, S. 283-290.

- [82] MORIWAKI, C., MORIYA, H.,
YAMAGUCHI, K., KIZUKI, K.,
FUJIMORI, H.: Intestinal Absorption of Pancreatic Kallikrein and some Aspects of its Physiological Role. In: Haberland, G.L., Rohen, J.W. (Eds.), Kallikrein-Kininogenases 1, Schattauer, Stuttgart 1973, S. 57-66

- [83] MOVAT, H.Z.: The Kinin System: Its Relation to Blood Coagulation, Fibrinolysis and the Formed Elements of the Blood. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 84, 1978, S. 143-202

- [84] MÜLLER-ESTERL, W.,
KUPFER, S. FRITZ, H.: Purification and Properties of boar Acrosin. Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 361, 1980, S. 1811-1821

- [85] OLEMOIYOI, O.,
SPRAGG, J. HALBERT, S.P.,
AUSTEN, K.F.: Immunologic Reactivity of Purified Human Urinary Kallikrein (Uro-Kallikrein) with Antiserum Directed Against Human Pancreas. J. Immunol. 118, 1977, S. 667-672

- [86] OUCHTERLONY, O.: Antigen-antibody reactions in gels. IV. Type of reactions in coordinated systems of diffusion. Acta Pathol. Microbiol. Scand. 32, 1953, S. 231-239

- [87] OVERLACK, A., STUMPE, K.O.,
ZYWZOK, W., RESSEL, C.,
KRÜCK, F.: Defect in Kallikrein-Kinin-System in essential hypertension and reduction of blood pressure by orally given Kallikrein. Adv. Exp. Med. Biol. Vol. 120 B, 1979, S. 539-548

- [88] OVERLACK, A., STUMPE, K.O.,
RESSEL, C., KOLLOCH, R.,
ZYWZOCK, W., KRÜCK, F.: Decreased Urinary Kallikrein activity and elevated blood pressure normalized by orally applied Kallikrein in essential Hypertension. *Klin. Wo.* 50, 1980, S. 37-42

- [89] PALM, S.,
FRITZ, H.: Components of the Kallikrein-Kinin-System in human midcycle cervical mucus and seminal plasma. In: Haberland, G.L., Rohen, J.W., Schirren, C., Huber, P. (Eds.): *Kallikrein-Kininogenases 2*, Schattauer, Stuttgart 1975, S. 17-21

- [90] PRIBRAM, H.,
HERRNHEISER, S.: Zur Kenntnis der dialysablen Bestandteile des Menschenharns. *Biochem. Z.* 111, 1920, S. 30

- [91] RATNOFF, O.D.: Some recent advances in the study of hemostasis. *Circ. Res.* 35, 1974, S. 1

- [92] RICHTERICH, R.: *Klinische Chemie*, Akademische Verlagsgesellschaft, 2. Auflage, Frankfurt/M. 1968, S. 303-304

- [93] RIXON, R.H.,
WHITEFIELD, J.F.: Kallikrein, Kinin and Cell Proliferation. In: Haberland, G.L., Rohen, J.W. (Eds.), *Kallikrein-Kininogenases 1*, Schattauer, Stuttgart 1973, S. 131-145

- [94] ROBARD, D., BRIDSON, W.,
RAYFORD, P.L.: Rapid Calculation of Radioimmunoassay Results, *J. Lab. Clin. Med.* 74, 1969, S. 770-781

- [95] ROCHA DE SILVA, M.,
BORALDO, W.T.,
ROSENFELD, G.: Bradykinin, a Hypotensive and Smooth Muscle Stimulating Factor Released from Plasma Globulin by Snake Venoms and by Trypsin. *Am. J. Physiol.* 156, 1949, S. 261-273

- [96] ROHEN, J.W., BUSCHHÜTER, H., Morphometric Studies of Fracture Repair after Kallikrein Treatment. In: Haberland, G.L. et al. (Eds.), Kallikrein-Kininogenases 3, Schattauer, Stuttgart 1975, S. 227-235
- [97] ROHEN, J.W., FUNK, R., LELIEVRE, A.: Influence of Kallikrein on Bone Fracture Repair. In: Haberland, G.L. et al. (Eds.), Kallikrein-Kininogenases 4, Schattauer, Stuttgart 1977, S. 209-214
- [98] ROHEN, J.W., HABERLAND, G.L.: Wirkungen des Kallikrein-Kinin-Systems bei pankreatektomierten Ratten. Med. Welt 28, 1977, S. 30-32
- [99] ROHEN, J.W., PETERHOFF, J.: Stimulation of mitotic activity by Kallikrein in the gastrointestinal tract of rats. In: Haberland, G.L., Rohen, J.W. (Eds.), Kallikrein-Kininogenases 1, Schattauer, Stuttgart 1975, S. 57-66
- [100] ROSEN, F.S., ALPER, C.A., PENSKEY, J.: Genetically determined heterogeneity of the C1 esterase inhibitor in patients with hereditary angioneurotic edema. J. Clin. Invest 50, 1971, S. 2143-2149
- [101] RUMPELTES, H., KOEPPE, P., PRIBILLA, W.: Influence of a Kallikrein-Preparation (BAY d 7687) on the Intestinal Absorption of Vitamin B₁₂ in Man. In: Haberland, G. L. et al. (Eds.), Kallikrein-Kininogenases 3, Schattauer, Stuttgart 1975, S. 63-72
- [102] SAAMELI, K., ESKES, T.: Bradykinin and cardiovascular system: Estimation of half-life. Am. J. Physiol. 203, 1962, S. 203 + 261
- [103] SEALEY, J.E., ATLAS, S.A., LARAGH, J.H.: Human urinary kallikrein converts inactive to active renin and is a possible physiological activator of renin. Nature 275, 1978, S. 144-145

- [104] SEKI, T., NAKAJIMA, T.,
ERDÖS, E.G.: Colon Kallikrein, its Relation to the Plasma Enzyme. *Biochemical Pharmacology*, Vol. 21, 1972, S. 1227-1235, Pergamon Press
- [105] SICUTERI, F., BECK, N.,
HABERLAND, G.L.: Kinins-Pharmacodynamics and Biological Roles. *Adv. Expt. Med. Biol.* Band 70, Plenum Press, New York 1976
- [106] SCHILL, W.B.: Kallikrein, as a therapeutical Means in the Treatment of Male Infertility. In: Haberland, G.L. et al. (Eds.), *Kallikrein-Kininogenases 4*, Schattauer, Stuttgart 1977, S. 251-280
- [107] SCHIRREN, C.: Clinical Experiences with Kallikrein on Subfertile Males. In: Haberland, G.L. et al. (Eds.), *Kallikrein-Kininogenases 4*, Schattauer, Stuttgart 1977, S. 247-250
- [108] SCHIRREN, C.: Kallikrein in der Andrologie; Fortschritte in der Andrologie - Vol. 6, Grosse-Verlag, Berlin 1978
- [109] SCHÜTTE, B., EGGERT, J.,
LINDNER, I.: The Effect of Kallikrein on the DNA Content and Synthesis of Embryonic and Postembryonic Tissues. In: Haberland, G.L. et al. (Eds.), *Kallikrein-Kininogenases 3*, 1975, S. 147-175
- [110] SCHÜTTE, B.,
LINDNER, I.: Additional Aspects of the Effect of Kallikrein on Cell Proliferation. In: Haberland, G.L. et al. (Eds.), *Kallikrein-Kininogenases 4*, 1977, S. 161-177
- [111] SCHÜTTE, B.,
SCHIRREN, C.: Die therapeutische Anwendung von Kallikrein bei Patienten mit Motilitätsstörungen der Spermatozoen. *Z. Hautkr.* 52 (18), 1977, S. 930-934
- [112] STEINBUCH, M.,
AUDRAN, R.: The Isolation of IgG from Mammalian Sera with the Acid of Caprylic Acid. *Arch. Biochem. Biophys.* 134, 1969, S. 279-284

- [113] TRAUTSCHOLD, I.: Enzyme und Inhibitoren der Bildung und des Abbaues gefäßaktiver Polypeptide (Kinine), Habilitationsschrift, 1965
- [114] TRAUTSCHOLD, I.,
WERLE, E., SCHWEITZER, G.: Kallikrein. In: Bergmeyer, H.U. (Eds.), Methoden der enzymatischen Analyse, 2. Auflage, 1970, S. 1011-1020
- [115] TRUSCHEIT, E.: Anwendungsgebiete der Enzymtherapie. Pharmaberichte Bayer 19, S. 12-23
- [116] VANE, J.R.,
FERREIRA, S.H.: Interaction between bradykinin and prostaglandins. In: Pisano, J.J. Austen, F. (Eds.), 1976, S. 255-266
- [117] VOGEL, R.,
WERLE, E.: Kallikrein inhibitors. In: Erdös, E.G. (Eds.) Bradykinin, Kallidin and Kallikrein, Springer, Berlin, 1970, S. 213-249
- [118] WEBSTER, M.E.: Kallikreins in glandular tissue. In: Erdös, E.G. (Eds.), Bradykinin, Kallidin and Kallikrein, Springer, Berlin, 1970, S. 131-155
- [119] WEBSTER, M.E.,
PIERCE, I.V.: The nature of Kallidins released from human plasma by kallikreins and other enzymes. Ann. N.Y. Acad. Sci. 104, 1963, S. 91
- [120] WEISS, A.S., GALLIN, J.I.,
KAPLAN, A.P.: Fletcher factor deficiency: A diminished rate of Hageman factor activation caused by absence of prekallikrein with abnormalities of coagulation, fibrinolysis, chemotactic activity and kiningeneration. J. Clin. Invest. 53, 1974, S. 622-633
- [121] WERLE, E.: Die Wirkung des Kallikreins (- Padutin) auf den isolierten Darm. Klin. Wochenschrift 15, 1936, S. 848-849
- [122] WERLE, E.: Kallikrein, Kallidin and related Substances. In Polypeptides which affect Smooth Muscles and Blood Vessels. Schachter, M. (Ed.), Pergamon-Press, London, 1960, S. 199-209

- [123] WERLE, E.,
BEREK, U.: Zur Kenntnis des Kallikreins. Angew.
Chem. 60 A, 1948, S. 53
- [124] WERLE, E.; GÖTZE, W.,
KEPLER, A.: Über die Wirkung des Kallikreins auf
den isolierten Darm und über eine
neue darmkontrahierende Substanz.
Biochem. Z. 289, 1937, S. 217-233
- [125] WERLE, E.,
HÜRTER, J.: Ornitho-Kallikrein. I. Kreislaufaktive
Substanzen der Vögel. Biochem. Z.
285, 1936, S. 175-191
- [126] WERLE, E.,
KORSTEN, H.: Der Kallikreingehalt des Harns, des
Speichels und des Blutes bei Gesunden
und Kranken. Z. ges. exp. Med. 103,
1938, S. 153-162
- [127] WERLE, E.,
VOGEL, R.: Über die Freisetzung einer kallikreinar-
tigen Substanz aus Extrakten verschie-
dener Organe. Arch. int. pharmacodyn
131, No. 3-4, 1961, S. 257-261
- [128] WERLE, E., VOGEL, R.,
KALIAMPETOS, G.: Karger (Ed.), Basel, II, 778, 1962, II.
Weltkongreß für Gastroenterologie
- [129] WERLE, E.;
ZACH, P.: Verteilung von Kininogen im Serum
und Gewebe bei Ratten und anderen
Säugetieren. Z. Klin. Chem. Klin.
Biochem. 8, 1970, S. 186-189
- [130] WICKLMAYR, M., DIETZE,
MAYER, L., BÖTTGER, T.,
GRUNST, J.: Evidence for an involvement of kinin
liberation in the priming Action of
insulin on Glucose uptake into Skeletal
Muscle, Febs Letters 98, 1979, S. 61-65
- [131] WORTHINGTON, K.J.
CUSCHIERI, A.: Activation and release of proteolytic
Kinin-forming enzymes from rat jejunal
loops perfused with hyperosmolar
glucose solutions. Gut 18, 1977, S.
279-283
- [132] WUEPPER, K.D.: Prekallikrein deficiency in man. J. Exp.
Med. 138, 1973, S. 1345-1355

- [133] YANG, H.Y.T.,
ERDÖS, E.G.:
Second Kininase in human plasma.
Nature 215, 1967, S. 1402
- [134] ZEITLIN, I.J.:
Kinin release associated with the
gastrointestinal tract. In: Sicuteri,
F. et al. (Eds.), Bradykinin and related
Kinins, Plenum Press, New York, 1970,
S. 329-339
- [135] ZEITLIN, I.J.:
Pharmacological characterization
of kinin-forming activity of the rat
intestinal tract. Br.J. Pharmac. 42,
1971, S. 648-649
- [136] ZEITLIN, I.J.:
Rat Intestinal Kallikrein. In: Vasoactive
Peptides, Back, N., Sicuteri, F. (Eds.)
1972, S. 289-296
- [137] ZEITLIN, I.J., SINGH, Y.N.,
LEMBECK, F., THEILER, M.:
The Molecular Weights of Plasma
and Intestinal Kallikreins in Rats.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.
293, 1976, S. 159-161
- [138] ZEITLIN, I.J.,
SMITH, A.N.:
5-hydroxyindoles and Kinins in the
Carcinoid and dumping syndromes.
Lancet 2, 1966, S. 986-991
- [139] ZEITLIN, I.J.,
SMITH, A.N.:
Mobilization of tissue Kallikrein in
Inflammatory disease of the colon.
Gut 14, 1973, S. 133-138
- [140] ZIMMERMANN, A., GEIGER, R.,
KORTMANN, H.:
Similarity between a Kininogenase
(Kallikrein) from Human Large Intestine
and Human Urinary Kallikrein. Hoppe
Seyler's Z. Physiol. Chem. 360, 1979,
S. 1767-1773
- [141]
Affinity Chromatographie - Principles
and Methods. Pharmacia Fine Chemicals,
Uppsala 1976
- [142]
Application: Sephacryl S-200 Superfine,
Pharmacia fine Chemicals, Uppsala

LEBENS LAUF

28. August	1949	Geburt in München als zweiter Sohn des Zahnarztes Dr. med. dent. Erich Zimmermann und seiner Ehefrau Irene Zimmermann, geb. Heichele
September	1956	Besuch der Volksschule in München
September	1960	Übertritt an das Math.-Naturwissenschaftliche Erasmus-Grasser-Gymnasium in München
20. Juni	1970	Reifeprüfung an derselben Schule
1. Juli 31. Dezember	1970- 1971	Ableistung des Grundwehrdienstes bei der Bundeswehr als Sanitäter und Krankenpfleger
November Oktober	1972- 1973	2 Semester Chemiestudium an der Ludwig-Maximilians-Universität, München
November	1973	Beginn des Humanmedizin-Studiums an der Ludwig-Maximilians-Universität, München
April/Mai	1980	Abschluß des Medizinstudiums an der Ludwig-Maximilians-Universität, München
ab Oktober	1980	Tätigkeit als Assistenzarzt an der Frauenklinik, Starnberg am See
Oktober	1983	Heirat
10. März	1984	Geburt meines Sohnes David

Axel Hummer

